

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Validación del péptido intestinal vasoactivo (VIP) como
biomarcador pronóstico en enfermedades reumáticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Iria Valiño Seoane

Directoras

Rosa Pérez Gomariz
M^a Carmen Martínez Mora

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Validación del Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) como
Biomarcador Pronóstico en Enfermedades Reumáticas**

Directoras: Rosa Pérez Gomariz y M^a Carmen Martínez Mora

Iria Valiño Seoane

2018



Facultad de Ciencias Biológicas

C/ José Antonio Novais nº 12.
Ciudad Universitaria 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 49 81. Fax: 91 394 49 81

La Dra. **Rosa Pérez Gomariz**, Catedrática de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid y la Dra. **María del Carmen Martínez Mora**, Profesora Titular de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que **Iria Valiño Seoane**, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado: “Validación del Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) como Biomarcador Pronóstico en Enfermedades Reumáticas”, como Tesis Doctoral, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 14 de Noviembre de 2017

VºBº DIRECTORAS:

Fdo: Rosa Pérez Gomariz

Fdo: M^a Carmen Martínez Mora

Vº Bº TUTORA:

Fdo: Rosa Pérez Gomariz

LA DOCTORANDA:

Fdo: Iria Valiño Seoane

*A mis Avós, Charo y Xosé Lois,
por absolutamente todo.*

*Defiende tu derecho a pensar, porque
incluso pensar de manera errónea es
mejor que no pensar.*

Hipatia de Alejandría

Agradecimientos

Legendo un artículo sobre artritis, no sé bien a cuento de qué, aparecía una frase del filósofo Søren Kierkegaard que decía algo así como “la vida ha de ser vivida hacia delante, pero sólo puede ser comprendida hacia atrás”. Al leerlo me di cuenta de que me hablaba directamente a mí. Hoy, tras muchos años, llego por fin a este punto en que termino una gran etapa y empezaré otra nueva, pero no puedo hacerlo sin mirar antes hacia atrás para agradecer a todos vuestra imprescindible compañía en este camino.

En primer lugar, miles de gracias a mi grupo VIP, porque sin ellos esto no habría sido posible y en especial a mis directoras. Rosa, gracias por todo. Como (proto)científica y como mujer me siento orgullosa de tener una jefa que marca la diferencia en su forma de dirigir este grupo. Gracias por elegirme y confiar en mí, por amadrinarme durante estos años, por tu cariño y tu comprensión en tiempos buenos y malos y por enseñarnos mucho de ciencia pero también mucho de humanidad, porque “antes que científicos somos personas”. MCarmen, gracias por tu inagotable optimismo y tu cariño e interés constantes. Por tu rigurosidad y perfeccionismo en el trabajo y por haber sabido estar cerca en lo científico y en lo personal enseñándome tanto durante todos estos años.

El resto del equipo tampoco se ha quedado atrás. Gracias a otra de nuestras “mamis”, Yasmina, por tus ánimos, tu buen humor y energía positiva permanentes, por tu cariño y por el bizcocho de naranja de la Thermomix. Mi otra alcarreña favorita, Irene, en muchos sentidos eres la horma de mi zapato (¡freaky!), porque me he reído mucho contigo, porque puedo mandarte a freír espárragos y tú a mí, porque siempre tiras para delante con una sonrisa, gracias por todo este tiempo juntas. Raúl, nuestro XY que sobrevive entre el mujerío, gracias por tu compañía y afecto, porque siempre nos aportas algo extra en cualquier conversación. Y gracias a Selene, por guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio y por el tiempo que hemos compartido más allá de esas paredes. Mar, perla, continúa leyendo.

Esta pequeña familia se amplía un poquito más con tantos ilustres miembros de nuestro Departamento de Biología Celular. Con muchos de vosotros, de un modo u otro, he tenido la oportunidad de pasar tiempo en las prácticas, en nuestros cafés y nuestras comidas de celebración-por-el-motivo-que-sea, y todos habéis pasado así a formar parte de esto también. A los “zapatiños”, David, Sarita y Javi, por ser durante estos años esos vecinos a los que uno siempre puede recurrir en busca de una “cucharadita de azúcar”, un montaje fotográfico o unas risas, lo que se tercie. Y al jefe, gracias Zapata, por robarnos colines mientras debatimos sobre el estado del mundo y nos reímos por no llorar. Gracias Teresa, por ser la secretaria más eficiente y majísima de toda la Universidad; por tu cariño, interés y ánimos continuos en este y otros frentes. Al padrazo del departamento, Benjamín, porque nos alegras siempre

a todos dándonos esos “buenos días” tan tuyos y por tus visitas en tiempos de enclaustramiento para saber cómo iba progresando la escritura. A Agustín, por las tartas y bromas compartidas y por sus consejos, recordatorios y paciencia sobre cualquier cosa relacionada con el programa de doctorado. A Javier por su compañía en los “cafelitos” y por enseñarme el arte del microtomo. A Nerea e Íñigo, por esa retranca y humor inteligente tan necesarios. A nuestras técnicas, Mar e Isabel y a todos los demás que hacéis que nuestro Departamento sea como es.

No puedo pasar por alto mi segunda casa científica durante estos años, el Hospital de la Princesa. Gracias a todos los princes@s, los paco's, los del Norte, Eugenio, Rocío, Rafa, Pablo, Dani, y un largo etc. del Instituto de Investigación Sanitaria por acogerme y hacerme sentir como una más desde el primer momento y durante tanto tiempo. Y especialmente a personas como Noe, Lola, Cris y Raquel, por su cariño y preocupación y por hacerme “puto” reír en tantas ocasiones. A Ana, que empezó siendo mi joven padawan, gracias por tu simpatía, tu buen humor y cariño y por casi quemar la cafetería juntas tratando de tostar pan; imposible olvidar aquel “no puedo lria, ¡es fuego!”. Gracias al Servicio de Reumatología, por pelear por cada muestra, cada dato, cada artículo, porque sin vosotros este trabajo no podría concebirse. Gracias a grandes profesionales y personas como Txaro y Eva y, especialmente, a mi mentor en el apasionante mundo del Stata, Isidoro, por ser responsable de que entienda infinitas tablas de regresiones logísticas ordenadas y por todas sus contribuciones en este largo camino.

Amalia, personas como tú hacen más fácil la vida. Siempre dispuesta a darlo todo en cada frente abierto, eres un ejemplo. Gracias por acogerme siendo una polluela y enseñarme tanto de genética, por compartir mano a mano este trabajo desde el principio, por dejarme tirada para irte a dar a luz a Andrés (¡qué cosas tienes!), por valorar siempre mi opinión, por nuestro mega congreso en Washington, por los cambios vitales compartidos, por dejarme las llaves del despacho 33 para gestar allí esta tesis... En resumen, porque en ti encontré a una gran amiga.

En este camino científico otros muchos compañeros han aportado su granito de arena en forma de consejos, muestras, colaboraciones... Por eso, gracias a todos los grupos de la RIER, con los que compartimos nuestros pasos científicos y de los que aprendemos tanto. Agradecimiento especial a los chicos del López Neyra de Granada por una semana intensa de P-link, iChip y diversión; y al equipo del CNB, capitaneado por Mario, que siempre sabe sacar el lado bueno de todo con una mirada crítica pero amable y constructiva.

Me prometí a mí misma no extenderme hasta el infinito con esto, pero, lo siento... solo ha sido el principio. De perdidos al río.

Dicen que los amigos son la familia que eliges, así que después de muchos años sin que hayáis perdido la capacidad aguantarme se ve que he elegido bien.

No podría imaginarme la vida sin mis maravillosas y sabias biólogas, Alioli y Cristóteles. GRACIAS de todo corazón por tantos años de amistad, por tantos tupperes compartidos en el suelo de los pasillos de la Facultad, por poder hablar de todo siempre y pase lo que pase, por nuestros audios infinitos, por vuestros consejos (siempre sabios y acertados), por nuestras penas y alegrías, porque con un “hola” sea suficiente para detectar lo que nos pasa, por vuestra generosidad sin límite, por vuestros abrazos que me han reconfortado en tantas ocasiones, por reír hasta que nos duele el cuerpo y por hablar hasta la afonía total (y hasta que nos echan de los restaurantes chinos). Ali, nunca soltaré una cuerda que me lances. Cris, nunca te dejaré soltar una cuerda que te lance yo. Hemos crecido tanto juntas que no puedo pensar en dar ni un solo paso en el camino sin teneros a mi lado para hacerlo y que juntas analicemos las mil y una formas posibles de abordarlo.

Mareta, flower, cómo lo resumo... Me siento orgullosa y agradecida por ser tu compañera, pudiendo aprender de ti cada día sobre el esfuerzo, el trabajo duro y la honestidad. Pero muy por encima de eso me siento tremendamente afortunada por ser tu amiga. No tengo palabras para agradecerte tu compañía cada día dentro y fuera del labo, por darme siempre perspectiva y fuerza, por tus abrazos que todo lo pueden reparar, por hablar sin decir palabra, por acabar riendo de llanto viendo la peor peli posible, por nuestro amor por el botellín frío, por ser mi Celestina, por entender mis manías y mis miedos como nadie y por compartirlo todo hablando en spanglish. GRACIAS. Y junto a una gran mujer siempre hay un gran hombre; gracias Alfonso, xiquet, por ser una de esas personas que saben estar cuando tienen que estar y que te alegran el día pase lo que pase.

Hay quienes tienen la capacidad de llenarte de cariño y fuerza desde la distancia, estén donde estén. Gracias a Betty, mi labmanager londinense favorita, por estar a mi lado durante estos años, por la masa cruda de bizcocho de chocolate, por hacerme reír a saco, por compartir la inmunología y las cervezas de después, por echarme un salvavidas en momentos de naufragio, por estar tan loca y molar tanto. Rocío, mi sister, porque con pocas personas consigue uno transmitir y recibir tanto con una simple mirada. Gracias porque por mucho tiempo que pase sigamos unidas.

La familia, sin duda, es otra de las grandes sufridoras de las tesis. Gracias a mis padres Rosario y Paco, sobre todo a mi madre por su espíritu noble, generosidad y cariño; a mis tíos, José y Margarita, y especialmente a Javier y Rosi por nuestros veranos en Coruña, por la tortilla de patata en Gandarío, por vuestro cariño, preocupación y ayuda en momentos clave. Y con ellos a mi prima, Nathalie, por las

tardes de verano entre chuches, palomitas y episodios infinitos de *Friends*, por las primeras noches de fiesta, por compartir tantas alegrías (y desgracias) a lo largo del camino.

Mis avós, Charo y Xosé Lois. Lleváis toda la vida enseñándome y aún quedaría material para unas cuantas tesis... Sin duda, si hay alguien a quien le debo todo en mi vida esos sois vosotros. La fortaleza, el sacrificio, la nobleza, la responsabilidad y el trabajo duro y bien hecho, son algunos de los muchos principios en los que me habéis educado y hecho crecer. Pero siempre dejando un hueco inmenso para el amor infinito, el apoyo incondicional, los abrazos que me han reconstruido cada vez que me he roto, el humor, el debate (la discusión, si hace falta), el calor y la seguridad del hogar que siempre he encontrado allí donde habéis estado vosotros.

Avoa, te adoro y lo sabes. Eres una de las personas más especiales que he conocido en mi vida; conocerte y quererte es todo uno. GRACIAS. Por tu simpatía natural, por tu generosidad sin límite, por nuestras conversaciones de amigas, por lo linda que eres por dentro y por fuera (verdaderamente ¡divina!), por presumir de tu nieta siempre con tanto orgullo, por tu valentía y sacrificio en la vida, por tu poder de calmar un llanto o de arrancar una carcajada, porque los “amores reñidos son los más queridos”, por criarme como a una hija y quererme tantísimo. Te sigo necesitando a mi lado en el camino por mucho que haya crecido.

Mi Avó, gran científico y mejor padre, la razón de tantas cosas, mi coautor principal. Tu ejemplo me llevó hacia la ciencia desde que era una pequeñaaja repelente que llevabas contigo a tu laboratorio del Instituto de Catálisis para hacer experimentos con nieve carbónica o a la Cuesta de Moyano, para que preguntara por el libro “Física y Microfísica” de Louis de Broglie ante la mirada atónita de los libreros. GRACIAS. Por obligarme a ser un poco mejor cada día, por enseñarme el valor del esfuerzo y la responsabilidad, por recordarme que la inteligencia sin trabajo no basta, por tu ayuda cada fin de semana con cientos (sí, ¡cientos!) de problemas de física, química y mates, por nuestros debates científicos..., pero sobre todo por tu amor, por criarme como a una hija y darme todo sin reservas. Me has salvado tantas veces de caer y me has recogido tantas veces del suelo que aún no me es posible imaginar la vida sin el paracaídas que me daba tu seguridad y tu confianza en mí. Y ahora, por fin, hemos llegado al final y me rompe el corazón que precisamente tú no estés aquí para vivir lo que hemos conseguido juntos. Pero nuestra Rosalía decía: “En todo estás e ti es todo, pra min i en min mesma moras, nin me abandonarás nunca, sombra que sempre me asombras”. Así, muy lejos de misticismos, sé que podrás verme y sé que tu espíritu de luchador infatigable estará conmigo ahora y siempre.

Gracias a mi “otra” familia, Aurora, José e Ignacio, por acogerme como una más, con tantísimo cariño y por haber estado a mi lado en estos últimos años haciendo que lo bueno sea mejor y que lo malo sea menos malo. Y por extensión, nuevas amistades han contribuido también a ello: Hugo y Bea, Clara, Manolo con el resto del clan guadarrameño; Helen, la otra gran Celestina y mejor persona/bailarina de swing; David y Rox, que nos han acompañado desde nuestros primeros pasos; JC, por los viernes de cenas y copas y por no darme permiso para agobiarme con la tesis.

Iván, auténtico descubridor de la célula Lander. Gracias por hacerme ver la vida con perspectiva, por intentar que me ría siempre a toda costa, por cortar mis bucles, porque podamos estar como regaderas y que nos parezca lo más normal, por esa capacidad de emocionarme con una melodía al piano, porque tu buen carácter no te deje enfadarte mucho conmigo por más que yo haga méritos, por tu generosidad, tu paciencia, apoyo y cariño incondicionales durante todo este proceso de tesis y más allá. Eres un gran compañero de vida. GRACIAS por aparecer y por quedarte a mi lado desde entonces.

A pesar de que esta palabra se repita 28 veces en estas pocas líneas, sé que aún me quedan más “gracias” en el tintero. Muchos años, muchas experiencias, muchas personas en muchos contextos. Por eso espero que TODOS os sintáis aludidos por este último y sonoro ¡GRACIAS!

Esta tesis ha sido financiada gracias a los proyectos del Insituto de Salud Carlos III **PI11/00195**, **PI14/00477**, del Programa RETICS, RIER **RD12/0009/0002**, **RD16/0012/0008** y del Ministerio de Economía y Competitividad **RTC-2015-3562-1**, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). La Doctoranda ha disfrutado de una beca del Ministerio de Educación Cultura y Deporte **FPU14/00237**



"Una manera de hacer Europa"



Abreviaturas

-A-

ABT: Abatacept

AC: Adenilato Ciclasa

ACPA: Anticuerpos contra proteínas citrulinadas (del inglés *Anti-citrullinated protein antibodies*)

ACR: Colegio americano de reumatología (del inglés *American College of Rheumatology*)

ADA: Adalimumab

ADAMTS: Desintegrina y metaloproteinasa con dominios de trombospondina (del inglés *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*)

ADN: Ácido desoxirribonucleico (en inglés *DNA, Deoxyribonucleic acid*)

AI: Artritis indiferenciada (en inglés *UA, Undifferentiated arthritis*)

AIA: Artritis inducida por adyuvante (del inglés *Adjuvant induced arthritis*)

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico (en inglés *cAMP, Cyclic adenosine monophosphate*)

Anti-CarP: Anticuerpos contra proteínas carbamiladas

Anti-CCP: Anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados

Anti-CD47: Anticuerpos contra CD47

Anti-VCAM: Anticuerpos contra vimentina citrulinada modificada

APRIL: Ligando inductor de la proliferación de células B (del inglés, *A proliferation-inducing ligand*)

AR: Artritis reumatoide (en inglés *RA, Rheumatoid arthritis*)

ARN: Ácido ribonucleico (en inglés *RNA, Ribonucleic acid*)

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero (en inglés *mRNA, Messenger RNA*)

ASAS: Estudio de evaluación de la espondilitis anquilosante (del inglés *Ankylosing Spondylitis Assessment Study*)

ASDAS: Índice de actividad de la enfermedad de la espondilitis anquilosante (del inglés *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*)

-B-

BAFF/BLyS: Factor activador de células B (del inglés *B-cell activating factor/ B Lymphocyte Stimulator*)

BASDAI: Índice de actividad de la espondilitis anquilosante de Bath (del inglés *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*)

BASFI: Índice funcional de la espondilitis anquilosante de Bath (del inglés *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*)

BMP: Proteína morfogenética del hueso (del inglés *Bone morphogenetic protein*)

Breg: Linfocito B regulador

-C-

C1M/C2M/C3M: fragmentos de colágeno tipo I, II y III degradados por metaloproteinasas (del inglés *fragments of MMP-degraded type I, II and III collagen*)

C5: Proteína del Complemento (convertasa)

CC: Quimiocinas tipo α

CCP: Péptidos cíclicos citrulinados (del inglés *Cyclic citrullinated peptides*)

CD: Células dendríticas (en inglés *DC, Dendritic cells*)

CD28: Clúster de diferenciación 28 (Receptor coestimulador)

CD40: Clúster de diferenciación 40 (Receptor coestimulador)

CD40L: Ligando de CD40 (Proteína coestimuladora)

CD80: Clúster de diferenciación 80 (Proteína coestimuladora)

CDAI: Índice clínico de actividad de la enfermedad (del inglés *Clinical Disease Activity Index*)

CDt: Células dendríticas tolerogénicas

CIA: Artritis inducida por colágeno (del inglés *Collagen-induced arthritis*)

CLIP: Péptido asociado a la cadena invariante de clase II (del inglés *Class II-associated invariant chain peptide*)

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CPA: Célula presentadora de antígenos (en inglés *APC, Antigen presenting cell*)

CRF: Factor liberador de corticotropina (del inglés *Corticotropin-releasing factor*)

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (del inglés *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*)

CTX-I/CTX-II: Telopéptido C terminal del colágeno tipo I y II (del inglés *C-telopeptide of type I and II collagen*)

CXC: Quimiocinas tipo β

CZP: Certolizumab pegol

-D-

DAG: Diacilglicerol

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño (del inglés *Damage-associated molecular patterns*)

DAS: Índice de actividad de la enfermedad (del inglés *Disease Activity Score*)

DAS28: Índice de actividad de la enfermedad en 28 articulaciones (del inglés *Disease Activity Score of 28 joints*)

DAS28-CRP: Índice de actividad de la enfermedad en 28 articulaciones calculado con la proteína C reactiva (del inglés *Disease Activity Score 28-joint count C reactive protein*)

DAS28-ESR: Índice de actividad de la enfermedad en 28 articulaciones calculado con la velocidad de sedimentación (del inglés *Disease Activity Score 28-joint count erythrocyte sedimentation rate*)

DKK-1: proteína Dickkopf-1

-E-

EA: Espondilitis anquilosante (en inglés *AE, Ankylosing spondylitis*)

EEA: Encefalomiелitis experimental autoinmune (en inglés *EAE, Experimental autoimmune encephalomyelitis*)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (del inglés *Epidermal growth factor*)

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal (en inglés *IBD, Inflammatory bowel disease*)

EM: Esclerosis múltiple (en inglés *MS, Multiple sclerosis*)

ERAP1: Aminopeptidasa del retículo endoplásmico (del inglés *Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*)

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés *Extracellular signal-regulated kinase*)

EspA: Espondiloartritis (en inglés *SpA, Spondyloarthritis*)

ESSG: Grupo de estudio europeo de espondiloartropatías (del inglés *European Spondyloarthritis Study Group*)

ETN: Etanercept

EULAR: Liga europea contra el reumatismo (del inglés *The European League Against Rheumatism*)

-F-

FAME: Fármaco modificador de la enfermedad (en inglés *DMARD Disease-modifying antirheumatic drug*)

Fc: Región cristalizable de las inmunoglobulinas (del inglés *Fragment crystallizable region*)

FcγR1/3: Receptores 1 y 3 de la región Fc de la inmunoglobulina gamma (del inglés *Receptor for the Fc region of immunoglobulins gamma*)

FLS: Sinoviocito fibroblástico (del inglés *Fibroblast-like synoviocyte*)

FR: Factor reumatoide (en inglés *RF, Rheumatoid factor*)

Fz: Receptor frizzled

-G-

GDApp: Actividad global de la enfermedad evaluada por el paciente (del inglés *Global disease activity assessed by the patient*)

GDApph: Actividad global de la enfermedad evaluada por el médico (del inglés *Global disease activity assessed by the physician*)

GDP/GTP: Guanosín difosfato/trifosfato

GHFR: Factor liberador de la hormona del crecimiento (del inglés *Growth hormone-releasing factor*)

GIP: Péptido inhibidor gástrico (del inglés *Gastric inhibitory polypeptide*)

GLP1 y GLP2: Péptidos relacionados con el glucagón (del inglés *Glucagon-like peptide-1 and 2*)

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (del inglés *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GOL: Golimumab

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G (del inglés *G protein-coupled receptor*)

GRK: Cinasas del GPCR (del inglés *G protein-coupled receptor kinase*)

GWAS: Estudio de asociación del genoma completo (del inglés *Genome-wide association study*)

-H-

HAQ: Cuestionario de evaluación funcional (del inglés *Health assessment questionnaire*)

HAQ-S: Cuestionario de evaluación funcional adaptado a espondiloartropatías (del inglés *Health Assessment Questionnaire for Spondyloarthropathies*)

HLA: Antígeno leucocitario humano (del inglés *Human leukocyte antigen*)

hs-CRP: Proteína C reactiva de alta sensibilidad (del inglés *High sensitivity C-reactive protein*)

HUPI: Índice de actividad de la enfermedad para la artritis de inicio desarrollado en el Hospital Universitario de la Princesa (del inglés *Hospital Universitario La Princesa Index*)

-I-

IC: Inmunocomplejo

IFN: Interferon

IFX: Infliximab

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

IL-1R2: Receptor 2 de la interleucina 1

IL-23R: Receptor de la interleucina 23

IP₃: Inositol trifosfato

IRM: Imágen de resonancia magnetica (en inglés MRI, *Magnetic resonance imaging*)

-J-

JAK: Janus-cinasa (del inglés *Janus kinase*)

-K-

KIR: Receptor de las células Natural Killer (del inglés *Killer-cell immunoglobulin-like receptor*)

KO: knockout

-L-

LDA: Baja actividad de la enfermedad (del inglés *Low disease activity*)

LILR: Receptores leucocitarios tipo inmunoglobulina (del inglés *Leukocyte immunoglobulin-like receptors*)

LPS: Lipopolisacárido

LRP5/6: Receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (del inglés *LDL receptor-related protein 5 and 6*)

LTC: Linfocito T citotóxico (en inglés CTL, *Cytolytic T lymphocyte*)

-M-

MAC: Complejo de ataque a membrana (del inglés *Membrane attack complex*)

MAPK: Cinasa activada por mitógenos (del inglés *Mitogen-activated protein kinase*)

MBDA: Test de actividad de la enfermedad basado en multi-biomarcadores (del inglés *Multi-biomarker disease activity*)

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos (del inglés *Macrophage colony-stimulating factor*)

MEFV: Gen de la fiebre mediterránea familiar (del inglés *Familial mediterranean fever*)

MICA: Gen relacionado con la cadena de HLA de clase I (del inglés *MHC class I polypeptide-related sequence A*)

miRNA: microRNA

MLS: Sinoviocito de tipo macrofágico (del inglés *Macrophage-like synoviocyte*)

MMP: Metaloproteinasa de matriz (del inglés *Matrix metalloproteinase*)

mSASSS: Índice espinal modificado de Stoke para espondilitis anquilosante (del inglés *modified Stoke Ankysoling Spondylitis Spinal Score*)

MTX: Metotrexato

-N-

NET: Trampas extracelulares de neutrófilos (del inglés *Neutrophil extracellular trap*)

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NIM: Neuroinmunomodulación

NK: Linfocito citolítico natural (del inglés *Natural Killer T cell*)

NLR: Receptor tipo NOD (del inglés *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*)

-O-

OA: Osteoartritis o Artrosis (del inglés *Osteoarthritis*)

OC: Osteoclasto

OPG: Osteoprotegerina

OSCAR: Receptor asociado a osteoclasto (del inglés *Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor*)

-P-

PAC1: Receptor de PACAP

PACAP: Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (del inglés *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*)

PAD: Peptidil-arginina deiminasa (del inglés *protein arginine deiminase*)

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*)

pb: Pares de bases

PBL: Linfocito de sangre periférica (del inglés *Peripheral blood lymphocyte*)

PBMC: Célula mononuclear de sangre periférica (del inglés *Peripheral blood mononuclear cell*)

PCR: Proteína C reactiva (en inglés CRP, *C reactive protein*)

PHI: Péptido histidina-isoleucina

PHM: Péptido histidina-metionina

PIP₂: Fosfatidil inositol difosfato (del inglés *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PKA: Proteína cinasa A (del inglés *Protein kinase A*)

PKC: Proteína cinasa C (del inglés *Protein kinase C*)

PLC: Fosfolipasa C (del inglés *Phospholipase C*)

PLD: Fosfolipasa D (del inglés *Phospholipase D*)

PoC: Prueba de concepto (del inglés *Proof of concept*)

Pre-AR: Artritis reumatoide en estado pre-clínico

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones (del inglés *Pattern recognition receptor*)

PTH: Hormona paratiroidea (del inglés *Parathyroid hormone*)

PTPN22: Gen de la proteína tirosina fosfatasa no receptora de tipo 22 (del inglés *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*)

-R-

RAMP: Proteína modificadora de la actividad del receptor (del inglés *Receptor activity-modifying protein*)

RANK: Receptor activador para el factor nuclear κ B (del inglés *Receptor activator of nuclear factor κ B*)

RANKL: Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (del inglés *Receptor activator of nuclear factor κ B ligand*)

RE: Retículo endoplásmico (en inglés ER, *endoplasmic reticulum*)

RTX: Rituximab

-S-

SAA: Amiloide sérico A (del inglés *Serum amyloid A*)

SDAI: Índice de actividad de la enfermedad simplificado (del inglés *Simplified Disease Activity Index*)

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido (del inglés *Single nucleotide polymorphism*)

SPARTAN: Red de investigación y tratamiento de espondiloartritis (del inglés *Spondyloarthritis Research and Treatment Network*)

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción (del inglés *Signal transducer and activator of transcription*)

-T-

T2T/TTT: Estrategia del tratamiento de la AR hacia objetivos específicos (del inglés *Treat to target*)

TCR: Receptor de la célula T (del inglés *T cell receptor*)

TCZ: Tocilizumab

TGF- β : Factor de crecimiento transformador beta (del inglés *Transforming growth factor β*)

Th: Linfocito T colaborador (del inglés *T helper*)

TIMP: Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (del inglés *Tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TLR: Receptor tipo Toll (del inglés *Toll like receptor*)

TNFRSF1A: Receptor 1A del TNF (del inglés *TNF receptor superfamily member 1A*)

TNFSF15: Superfamilia 15 del TNF (del inglés *TNF superfamily 15*)

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés *Tumor necrosis factor*)

TRADD: Molécula de señalización de dominio de muerte asociada al receptor 1 del TNF (Del inglés *TNF receptor type 1-associated DEATH domain protein*)

TRAF1-C5: Factor asociado al receptor de TNF/ componente 5 del Complemento (del inglés *TNF-receptor associated factor 1/Complement component 5*)

TRAP: Fosfatasa ácida resistente al tartrato (del inglés *Tartrate-resistant acid phosphatase*)

Treg: Linfocito T regulador

-U-

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés *Unfolded protein response*)

-V-

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés *Vascular endothelial growth factor*)

VEs: Vesículas extracelulares

VICM: Fragmentos de vimentina citrulinada y degradada por MMPs (del inglés *Fragments of citrullinated and MMP-degraded vimentin*)

VIP: Péptido intestinal vasoactivo (del inglés *Vasoactive intestinal peptide*)

VPAC1: Receptor para VIP y PACAP tipo I

VPAC2: Receptor para VIP y PACAP tipo II

VSG: Velocidad de sedimentación globular (en inglés ESR, *Erythrocyte sedimentation rate*)

-W-

Wnt: Proteína tipo *Wingless* (del inglés *Wingless-type MMTV integration site family*)

-

β2m: β2 microglobulina

3'UTR: Región 3' no traducida (del inglés *3' Untranslated region*)

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Las enfermedades reumáticas	1
2. Artritis Reumatoide	2
2.1. Orígenes, epidemiología y manifestaciones clínicas de la AR	2
2.2. Factores etiológicos en la AR: genética, epigenética y ambiente	4
2.2.1. Comprensión actual de la etiología de la AR: integración de factores de riesgo y eventos autoinmunes	8
2.3. Fisiopatología de la AR: mecanismos moleculares y celulares implicados	10
2.3.1. El sistema inmune en la AR	10
2.3.1.1. Autoanticuerpos en la AR: potencial patogénico del FR y los ACPA	12
2.3.2. La inflamación de la membrana sinovial	15
2.3.2.1. Sinoviocitos fibroblásticos en la sinovitis	16
2.3.2.2. Macrófagos en la sinovitis	17
2.3.2.3. Células T en la sinovitis	17
2.3.2.4. Células B en la sinovitis	20
2.3.3. Alteraciones estructurales en la AR	21
2.3.3.1. Destrucción del cartílago Articular en la AR	21
2.3.3.2. Erosión ósea en la AR	22
2.3.4. Citocinas en la AR	24
2.3.4.1. El papel de la Interleucina 6 en la AR	27
2.4. Evaluación clínica de la AR	29
2.4.1. Criterios de diagnóstico y clasificación en la AR	29
2.4.2. Índices de actividad de la enfermedad en la AR	30
2.5. Estrategias terapéuticas en la AR	33
2.5.1. La ventana de oportunidad en la AR	36
2.5.2. La Artritis pre-clínica: evaluación del riesgo	38
2.5.3. Limitaciones a la medicina personalizada	39
3. Espondiloartritis	41
3.1. Orígenes, epidemiología y manifestaciones clínicas de la EspA	41
3.2. Patogénesis de la EspA: genética y sistema inmune	42
3.2.1. El componente genético de la EspA	42
3.2.1.1. El papel de HLA-B27 en la EspA y su relación con ERAP1	44
3.2.2. El sistema inmune en la EspA	46
3.2.2.1. Autoinmunidad vs. Autoinflamación	46
3.2.2.2. El eje IL-23/IL-17 en la EspA	50
3.2.2.3. Otras células y citocinas implicadas en la patogénesis de la EspA	52
3.2.3. Alteraciones estructurales en la EspA: erosión y anquilosis	53

3.3.	Evaluación clínica de la EspA.....	57
3.3.1.	Criterios de diagnóstico y clasificación en la EspA.....	57
3.3.2.	Medidas de actividad de la enfermedad, funcionalidad y severidad en la EspA.....	59
3.4.	Estrategias terapéuticas en la EspA.....	60
3.4.1.	La espondiloartritis temprana y la ventana de oportunidad.....	63
4.	Biomarcadores	65
4.1.	¿qué es un biomarcador?.....	65
4.2.	Biomarcadores en enfermedades reumáticas: tipos y aplicaciones.....	65
4.3.	Biomarcadores en la Artritis reumatoide.....	66
4.3.1.	Biomarcadores de diagnóstico en la AR	67
4.3.1.1.	Autoanticuerpos: FR, ACPA y otros	67
4.3.1.2.	Otros biomarcadores con capacidad diagnóstica	68
4.3.2.	Biomarcadores de pronóstico, actividad y daño estructural en la AR...69	
4.3.3.	Biomarcadores de respuesta al tratamiento en la AR.....	71
4.3.4.	Otros biomarcadores emergentes.....	73
4.3.4.1.	La plataforma 14-3-3η.....	73
4.3.4.2.	CXCL13	74
4.3.4.3.	MicroRNAs.....	75
4.4.	Biomarcadores en la espondiloartritis.....	77
4.4.1.	Biomarcadores de diagnóstico en la EspA.....	77
4.4.2.	Biomarcadores de actividad de la enfermedad en la EspA.....	78
4.4.3.	Biomarcadores de daño estructural en la EspA.....	79
4.4.4.	Biomarcadores de respuesta al tratamiento en la EspA.....	81
5.	El péptido intestinal vasoactivo	83
5.1.	La neuroinmunomodulación.....	83
5.2.	El descubrimiento de VIP: un mediador neuroinmune	84
5.3.	Estructura bioquímica de VIP y su familia	87
5.4.	La genética de VIP	89
5.5.	Receptores de VIP.....	91
5.5.1.	Estructura y localización de los receptores de VIP	91
5.5.2.	Regulación de los receptores de VIP	92
5.5.3.	El receptor VPAC1.....	93
5.5.4.	El receptor VPAC2.....	94
5.5.5.	El receptor PAC1.....	95
5.6.	La señalización de VIP	96
5.7.	VIP en inflamación y autoinmunidad: agente terapéutico	98

5.7.1.	Papel de VIP en el sistema inmune	98
5.7.2.	Efecto de VIP en las enfermedades reumáticas	100
5.7.3.	VIP como agente terapéutico: limitaciones y perspectivas	102
II.	OBJETIVOS	105
III.	ARTÍCULOS	109
	Artículo 1	111
	Artículo 2	121
	Artículo 3	131
	Artículo 4	151
	Revisión	167
IV.	DISCUSIÓN	181
	i. Niveles séricos de VIP y su asociación con la severidad de la enfermedad: papel de VIP como marcador de severidad/pronóstico	183
	ii. Polimorfismos en el gen de VIP como predictores de sus niveles en suero y de pronóstico/severidad	189
	iii. Relevancia clínica de los receptores de VIP en la AR de reciente comienzo	193
V.	CONCLUSIONES	199
VI.	BIBLIOGRAFÍA	203
VII.	RESUMEN/ABSTRACT	239
VIII.	OTRAS PUBLICACIONES	251

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS

Las **enfermedades reumáticas** o **musculoesqueléticas** se definen como un conjunto de más de 200 desórdenes que comprenden desde varios tipos de artritis hasta la osteoporosis, pasando por múltiples enfermedades sistémicas de los tejidos conectivos (EULAR 2009, 2016).

La clasificación primaria de estas patologías se realiza en enfermedades inflamatorias y no-inflamatorias y se estima que un cuarto de la población europea, es decir, más de 120 millones de personas (EULAR 2016) y más de 53 millones de personas en Estados Unidos (www.arthritis.org 2016) sufren enfermedades reumáticas. De acuerdo con los últimos datos disponibles del estudio EPISER (Carmona et al. 2002), en el caso de la **población española** se calcula que un **25%** sufre alguna patología musculoesquelética y en el año 2016 se ha puesto en marcha la segunda fase de dicho estudio para recabar información actualizada sobre la epidemiología de estas enfermedades en nuestro país.

Las enfermedades reumáticas se caracterizan por **dolor** y una consiguiente **reducción** de la amplitud de **movimiento** y de la **función** en una o más áreas del sistema musculoesquelético. Por esta razón, constituyen uno de los principales problemas de salud relacionados con el trabajo en Europa, dada la **limitación funcional** que pueden originar, generando un gran **coste económico** (Gauthy 2007). Por otro lado, su elevada prevalencia y frecuente carácter crónico, suponen unos gastos sanitarios igualmente elevados, así como una de las causas más frecuentes de solicitud de pensiones por incapacidad (Woolf 2009). Dejando a un lado su coste monetario, es muy notable igualmente el **coste emocional** que suponen estas patologías, observándose que la prevalencia de ansiedad y depresión clínicas en personas afectadas por una enfermedad reumática es aproximadamente el doble de la observada en la población general (Geenen et al. 2012).

La etiología de estas enfermedades está aún por dilucidar, si bien se conoce la existencia de una compleja **interacción** de **factores** de riesgo, **genéticos** y **ambientales** tales como la edad avanzada, el sexo femenino, el hábito tabáquico, el sobrepeso, la falta de actividad física y el desempeño de ocupaciones que conduzcan a la sobrecarga de las articulaciones (EULAR 2009, 2016).

2. ARTRITIS REUMATOIDE

2.1. ORÍGENES, EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA AR

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad **crónica** autoinmune, caracterizada por **sinovitis** persistente, **inflamación sistémica** y presencia de **autoanticuerpos** como el factor reumatoide (**FR**), dirigido contra la región constante de la inmunoglobulina G (IgG) o los anticuerpos contra los péptidos citrulinados (**ACPA**) (Firestein 2003, Scott et al. 2010, Smolen et al. 2016a). La AR se asocia primariamente con inflamación, daño en las articulaciones sinoviales y un incremento de la discapacidad con el tiempo. A lo largo de los años se ha ido reconociendo cada vez más que esta enfermedad es realmente un **síndrome** muy amplio que comprende, entre otras manifestaciones, un aumento de morbilidad cardiovascular, riesgo de cáncer y osteoporosis y deterioro psicológico (Firestein 2014) (Fig. 1).

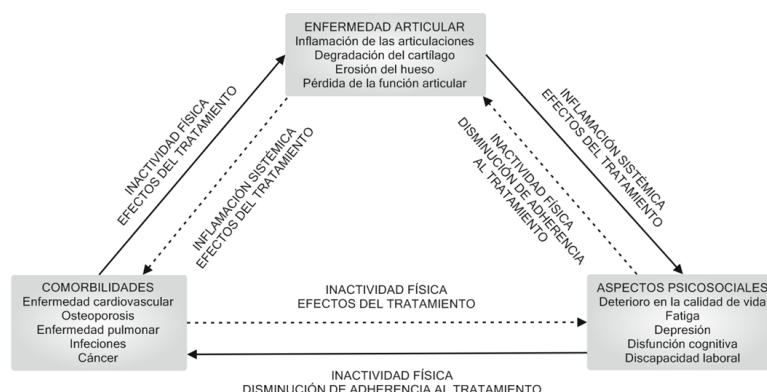


Figura 1. La carga de la enfermedad en la AR.

(Adaptada de Cutolo *et al.*, 2014)

De acuerdo con los estudios paleopatológicos, el origen de la AR se remonta a poblaciones nativas de América del Norte varios millones de años atrás, si bien, no aparecería en Europa hasta el siglo XVII, quedando retratada en obras pictóricas danesas como *La familia de Jordaens en un jardín*, de Jacob Jordaens. Sin embargo, no sería hasta 1957 cuando Charles Short describió de forma definitiva la AR claramente separada de otras patologías seronegativas para el FR o los ACPA como la osteoartritis (OA), el lupus eritematoso sistémico o las espondiloartropatías (Firestein 2003).

En los países industrializados esta enfermedad afecta al **0.5-1.0%** de los adultos, con 5-500/100.000 nuevos casos cada año (Scott et al. 2010) existiendo un aparente **gradiente** de Norte a Sur (en el hemisferio Norte) y de áreas urbanas a rurales (Smolen et al. 2016a).

Al tratarse de una enfermedad crónica supone un **elevado coste** tanto a nivel individual, a consecuencia del déficit musculoesquelético, la merma en la calidad de vida y la acumulación de riesgo de sufrir comorbilidades, como a nivel socio-económico por la reducción en la capacidad de trabajo y el elevado coste sanitario (Smolen et al. 2016a).

La AR es un tipo de **artritis poli-articular simétrica** que se inicia frecuentemente en las articulaciones sinoviales de manos, muñecas y pies, provocando **deformidad** y **discapacidad** funcional (Firestein 2003, Sweeney y Firestein 2004). El inicio de la enfermedad transcurre de forma lenta y progresiva, alternando periodos de exacerbación y remisión, e incluso pudiendo permanecer en una fase pre-clínica o **pre-AR** durante meses o incluso años (Firestein y McInnes 2017). En esta fase, los síntomas suelen ser de corte inespecífico, incluyendo astenia y debilidad o dolor musculoesquelético generalizados. Las manifestaciones articulares aparecen en etapas posteriores de la enfermedad (**AR temprana** o “clínicamente evidente”) en forma de dolor, rigidez, enrojecimiento e hinchazón articular, como consecuencia de la inflamación y derrame sinoviales, pudiendo llegar incluso a la anquilosis en estadios muy avanzados (**AR crónica** o “establecida”) (Arend y Firestein 2012, van Steenbergen et al. 2013, Firestein y McInnes 2017). La **membrana sinovial** o sinovia es el tejido más específicamente afectado por la respuesta inflamatoria persistente. Esta membrana está constituida por una delgada capa de tejido conectivo que limita la cavidad articular, ocupada por el líquido sinovial y que envuelve la articulación (SER 2014) (Fig.2). A este nivel se produce un **infiltrado** de células inflamatorias además de la alteración de las propias células residentes. Ambos factores conducen al establecimiento de una sinovitis crónica y al desarrollo de un tejido con comportamiento pseudotumoral denominado **pannus** que crece invadiendo y destruyendo el cartílago y el hueso adyacentes (Firestein 2003, Sweeney y Firestein 2004, Bartok y Firestein 2010).

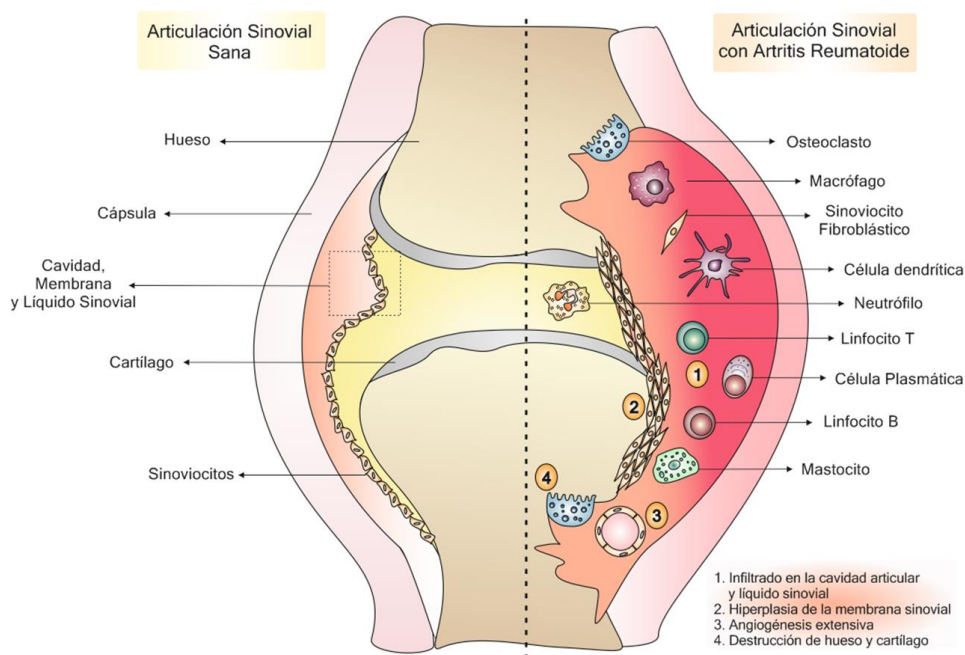


Figura 2. Esquema general de la articulación sinovial: estructura y elementos celulares en la articulación sana (parte izquierda de la imagen) y principales alteraciones observadas en la AR (parte derecha de la imagen).

En los casos en los que el control de la enfermedad es insuficiente se observan variadas **manifestaciones extra-articulares**, tales como vasculitis, aparición de nódulos subcutáneos, amiloidosis, linfoma y enfermedad pulmonar intersticial (Smolen et al. 2016a). Además, el estado de inflamación crónico se asocia a mayor probabilidad de eventos cardiovasculares (accidentes cerebro-vasculares, infartos, fallo cardíaco) y puede igualmente afectar a distintos órganos como el cerebro (fatiga y disfunción cognitiva), el hígado, las glándulas exocrinas (síndrome de Sjögren secundario), los músculos (sacropenia) y los huesos (osteoporosis) (McInnes y Schett 2011).

2.2. FACTORES ETIOLÓGICOS EN LA AR: GENÉTICA, EPIGENÉTICA Y AMBIENTE

Si bien la **etiopatogenia** de la AR no se conoce completamente, se sabe que es una enfermedad compleja resultado de la interacción entre genética y ambiente (Alamanos y Drosos 2005, McInnes y Schett 2011, Arend y Firestein 2012). El hecho de que el riesgo de padecer artritis se incremente entre 3 y 5 veces en caso de historia familiar de la enfermedad, así como las tasas de concordancia en estudios con hermanos gemelos, demuestran claramente el **componente genético** en la patogénesis de la AR (McInnes y Schett 2011, Smolen et al. 2016a). Además, la heredabilidad de esta enfermedad aumenta en los casos en que es seropositiva (40-65% frente a 20%) (Frisell et al. 2016). La combinación de nuevas tecnologías genéticas y la disponibilidad de cohortes de pacientes grandes y bien caracterizadas clínicamente, han permitido avanzar en el entendimiento de las bases genéticas de la enfermedad. Los estudios de asociación de genoma completo o **GWAS** (*genome-wide association studies*) con polimorfismos de un único nucleótido (**SNPs**, *single nucleotide polymorphisms*) han permitido caracterizar más de **100 loci** asociados a **riesgo de AR**, la mayoría implicados en mecanismos inmunes (Smolen et al. 2016a, Eyre et al. 2017) (Tabla 1).

El sistema **HLA** (*human leukocyte antigen*) de **clase II**, en particular el locus **HLA-DRB1**, sigue constituyendo una de las influencias genéticas dominantes en pacientes con artritis **seropositivos** para el FR o los ACPA (Scott et al. 2010, McInnes y Schett 2011, Smolen et al. 2016a). Alelos HLA-DRB1 asociados a la AR, entre otras enfermedades, contienen la secuencia común de codificación de los aminoácidos glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina (**QKRAA**) conocida como **epítipo compartido (EC)** localizada en la zona de presentación de antígenos al receptor de las células T (**TCR**) (McInnes y Schett 2011, Smolen et al. 2016a, Firestein y McInnes 2017, Viatte y Barton 2017). El epítipo compartido con vínculo más cercano a la AR incluye las variantes DRB*0401, DRB*0404, DRB*0101 y DRB*1402, ya que más del 90% de pacientes con AR expresan al menos una de ellas

(Firestein y McInnes 2017). Además, se sabe que determinados genotipos HLA se asocian con formas más agresivas de artritis y tasas de mortalidad más elevadas (Viatte et al. 2015, Viatte y Barton 2017). Todo ello sugiere que las **alteraciones** en el proceso de **presentación antigénica** juegan un papel clave en la respuesta inmune autorreactiva (McInnes y Schett 2011). Muchos otros de los alelos de riesgo identificados en la AR tienen relación con la regulación inmune. Tal es el caso de moléculas implicadas en la estimulación, activación y diferenciación de células T, como **PTPN22** o **CTLA4**, proteínas como **TRAF1-C5** con señalización dependiente del factor nuclear κ B (NF- κ B) o moléculas de las vías de co-estimulación como **CD28** y **CD40** (McInnes y Schett 2011, Smolen et al. 2016a, Firestein y McInnes 2017). Así como la contribución individual de los distintos *loci* de riesgo es modesta, la **presencia combinada** de esos genes puede actuar de forma sinérgica incrementando notablemente el riesgo; por ejemplo, la combinación de *loci* de HLA-DR, PTPN22 y TRAF1-C5 aumenta el riesgo de padecer la enfermedad en 40 veces (Firestein y McInnes 2017).

Tabla 1. Genes candidatos con SNPs potencialmente asociados a la patogénesis de la AR.

GEN CANDIDATO	LOCUS DEL SNP	RELACIÓN CON LA PATOGÉNESIS
ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T		
HLA-DRB1	6p21	Epítipo compartido. Involucrado en la presentación antigénica y responsable de la presentación de péptidos propios
PTPN22	1p13.2	Involucrado en la regulación del umbral de activación de los linfocitos
AFF3	2q11.2	Factor de transcripción para el desarrollo linfoide
CD28	2q33.2	Molécula coestimuladora para la activación de las células T
CD40	20q13.12	Molécula coestimuladora que potencia la interacción T-B y la producción de anticuerpos
CTLA4	2q33.2	Supresor de la coestimulación que regula las interacciones entre las CPA y las células T
IL2RA	10p15.1	Receptor de alta afinidad para la IL-2 en subpoblaciones linfocitarias
IL2	4q27	Citocina que regula la activación de células T (principalmente Treg)
IL21	4q27	Citocina que regula la diferenciación de células T (principalmente Th17) y la activación de las B
PRKCQ	10p15.1	Miembro de la familia de la PKC, regula la activación de células T y macrófagos
STAT4	2q32.2	Transduce señales de citocinas que regulan la proliferación, supervivencia y diferenciación linfocitaria
TAGAP	6q25.3	GTPasa-Rho, involucrada en la activación de las células T
VÍA DE NF-KB		
REL	2p16.1	Protooncogen que regula activación y supervivencia leucocitaria
TNFAIP3	6q23.3	Regulación negativa de la activación de NF-κB inducida por TNF
TRAF1	9q33.1	Regulación de la señalización a través de receptores de TNF
OTRAS VÍAS		
BLK	8p23.1	Tirosina cinasa linfoide implicada en la señalización del BCR y el desarrollo de las células B
CCL21	9q13.3	Quimioquina implicada en la formación de centros germinales
FCGR2A	1q23.2	Receptor de Fc de baja afinidad que regula: activación de macrófagos y neutrófilos y aclaramiento de inmunocomplejos
PADI4	1p36.2	Enzima que convierte la arginina en citrulina originando autoantígenos
PRDM1	6q21	Proteína represora de la expresión del gen del IFNβ
TNFRSF14	1p36.32	Superfamilia de receptores de TNF con actividad proinflamatoria

(Adaptada de McInnes, 2011)

Las **modificaciones epigenéticas** constituyen el nexo entre los factores de riesgo genéticos y ambientales en la AR. Gran variedad de mecanismos epigenéticos están implicados en la artritis, incluyendo la **metilación de ADN**, la modificación de **histonas** y la expresión de **microRNAs (miRNAs)**. Sin embargo, dado que la exploración de este campo es de reciente inicio, aún es difícil esclarecer si las alteraciones específicas de la enfermedad son heredadas, se desarrollan a lo largo de la vida de forma azarosa y si son causa o

consecuencia de la enfermedad (Firestein y McInnes 2017). Existen evidencias de la influencia que ejercen factores ambientales como el hábito tabáquico o la dieta en la actividad de las histonas desacetilasas (Klein y Gay 2015). Un estudio reciente de asociación a nivel de epigenoma ha identificado varias **metilaciones diferenciales** que podrían ser promotoras de riesgo genético en AR. Así mismo, la alteración en la acetilación de histonas y en la metilación del DNA pueden afectar notablemente a los sinoviocitos y los leucocitos (Liu et al. 2013, Smolen et al. 2016a). En el caso concreto de los sinoviocitos tipo fibroblasto (**FLS**, *fibroblast like synoviocyte*) se han identificado un gran número de *loci* diferencialmente metilados en los FLS de AR en comparación con los de personas sanas y de pacientes con OA (Nakano et al. 2013) y esa impronta, al parecer, contribuye a su fenotipo particularmente agresivo.

En un nivel adicional de regulación epigenética de los mecanismos celulares encontramos los **miRNAs** que se unen a RNA mensajeros conduciendo a su degradación o silenciamiento. Se han identificado distintos miRNAs con posible implicación en la patogénesis de la AR a través de la regulación del fenotipo de los sinoviocitos fibroblásticos, la activación de leucocitos y la producción de citocinas (Baxter et al. 2012). Algunos ejemplos representativos de miRNAs desregulados en AR son el **miR-124a** (supresión del ciclo celular y de la expresión de quimiocinas), el **miR-203** (su sobreexpresión incrementa la expresión de metaloproteinasas de matriz y de interleucina (IL)-6) y el **miR-155** (implicado en la activación de monocitos y la producción de citocinas a través de la regulación de la señalización del TCR) (Firestein y McInnes 2017).

Entre los **factores ambientales** asociados clásicamente a la AR ya hemos mencionado el **tabaco**, para el cual parece existir un efecto dosis-dependiente tanto en el riesgo de desarrollo de la enfermedad como en la severidad, la actividad y la reducción de las tasas de remisión de la misma (Alamanos y Drosos 2005, Kallberg et al. 2011, Sokolove et al. 2016); además, existe una clara asociación entre el hábito tabáquico y la presencia de ACPA y del epítipo compartido (Too et al. 2012, Sokolove et al. 2016). Un estudio reciente ha vinculado también la **polución**, en términos de exposición a dióxido de nitrógeno, con un incremento en el riesgo de desarrollar AR (Chang et al. 2016). La **dieta** parece jugar también un papel relevante, considerándose la denominada dieta Mediterránea como un posible factor protector frente a la enfermedad (Alamanos y Drosos 2005). Así mismo, se ha propuesto la ingesta de alcohol, el uso de anticonceptivos orales, niveles bajos de vitamina D o el bajo estatus socio-económico como otros posibles factores de riesgo ambientales (Liao et al. 2009). Finalmente, parece existir relación entre ciertos **agentes infecciosos** como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* o el virus de Epstein-Barr y la AR, pudiendo desencadenar

la patología mediante mecanismos de mimetismo molecular (McInnes y Schett 2011). En estudios con roedores se ha observado que la susceptibilidad y la severidad de la artritis disminuyen notablemente cuando se mantienen en un entorno libre de gérmenes o en presencia de flora bacteriana restringida (Liu et al. 2016), sugiriendo que el **microbioma** puede ejercer funciones adyuvantes que incrementan el proceso autoinmune en la patología. En humanos se ha observado relación entre la AR y la **periodontitis** causada por *Porphyromonas gingivalis* que, mediante la **PADI4** (peptidil arginina deiminasa tipo IV), provoca una citrulinación aberrante de proteínas y con ello la ruptura de la tolerancia a los péptidos citrulinados (Wegner et al. 2010). Una forma de actuación alternativa para esta bacteria reside en su posible unión al receptor tipo Toll-2 (**TLR-2**) (de Aquino et al. 2014), con lo que incrementaría la producción de **IL-1** estimulando la diferenciación de las células T hacia la subpoblación de células T colaboradoras o T *helper* 17 (**Th17**).

Para finalizar, cabe destacar el sesgo observado en virtud del **sexo** y la **edad**, dado que la prevalencia de la AR es mayor entre las mujeres (tres veces más frecuente que en hombres) y aumenta con la edad. El pico de incidencia se observa entre mujeres mayores de 65 años, sugiriendo la posible implicación de factores hormonales (Alamanos y Drosos 2005, Scott et al. 2010).

2.2.1. COMPRENSIÓN ACTUAL DE LA ETIOLOGÍA DE LA AR: INTEGRACIÓN DE FACTORES DE RIESGO Y EVENTOS AUTOINMUNES

En los últimos años han emergido con fuerza **teorías integradas** para esclarecer la etiopatogenia de la AR, en las cuales se concede un papel protagonista a las **mucosas**, dado que éstas son la interfaz entre las influencias externas y el sistema inmune. Las mucosas más asociadas con la artritis son las de los **pulmones**, la **cavidad oral** y el **tracto gastrointestinal**. Así, la AR, probablemente, se originaría muy lejos de las articulaciones (Fig. 3).

Una explicación plausible consistiría en que **eventos estresantes** en estos tejidos conducirían a las **modificaciones postraduccionales** de péptidos con la consiguiente formación de **autoanticuerpos** dirigidos contra los mismos. Estos anticuerpos generados en las mucosas se transferirían a todo el organismo a través del **torrente sanguíneo**,

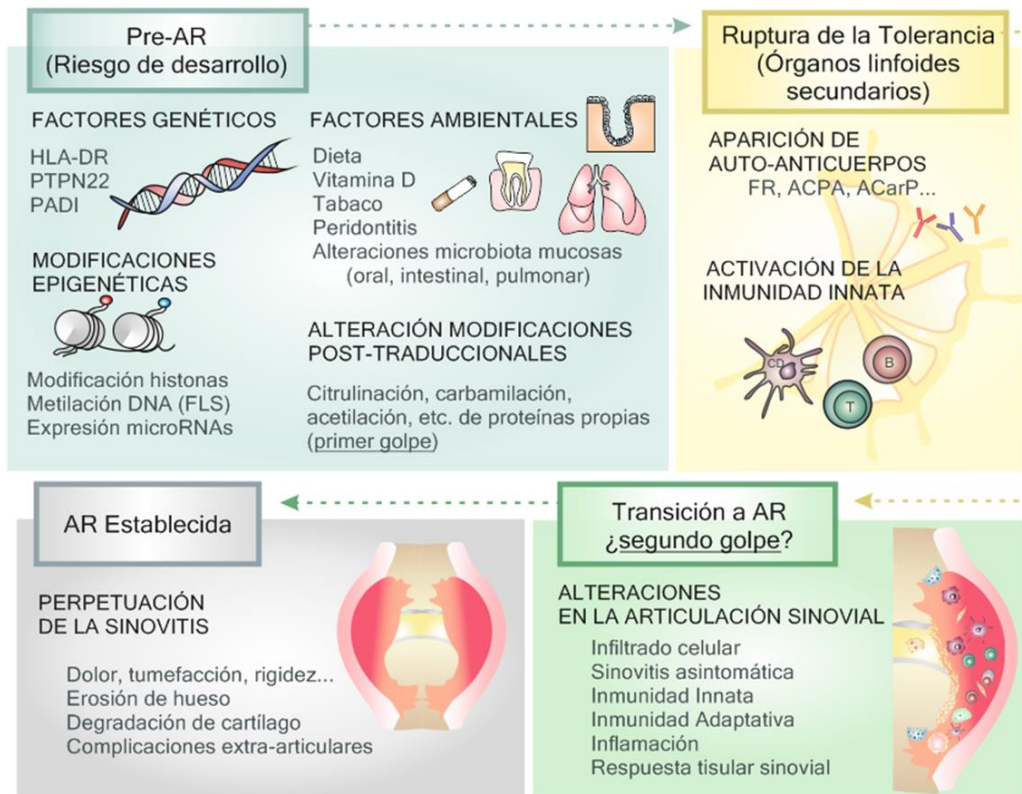


Figura 3. Comprensión actual de la secuencia de eventos que conducen al desarrollo y establecimiento de la AR.

convirtiendo el proceso de autoinmunidad local en autoinmunidad sistémica. Así, llegarían a la articulación, donde encontrarían antígenos adicionales. De este modo se desatarían eventos inflamatorios locales en la **sinovia** con la consiguiente activación de diferentes tipos celulares (fibroblastos, macrófagos, osteoclastos, etc.) que producirían citocinas proinflamatorias conduciendo a la sinovitis persistente y la destrucción del hueso y el cartilago (Catrina et al. 2016a, Catrina et al. 2016b, Tan y Smolen 2016).

Esta hipótesis se apoya en hechos como la relación, ya comentada, entre la infección por *P. gingivalis* y la AR (Mikuls et al. 2014) o la existencia de péptidos citrulinados comunes en el tejido bronquial y sinovial de pacientes con AR (Ytterberg et al. 2015) que, además, proporciona un nexo entre el hábito tabáquico y esta enfermedad. Otro ejemplo, en relación con la microbiota característica de las mucosas oral e intestinal, surge de un estudio de meta-GWAS del microbioma de ambas regiones en el que se ha observado que los pacientes con AR presentan una clara **disbiosis** que, además, se restablece parcialmente tras recibir tratamiento para la enfermedad (Zhang et al. 2015).

2.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA AR: MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES IMPLICADOS

2.3.1. EL SISTEMA INMUNE EN LA AR

La mayoría de las evidencias obtenidas en estudios genéticos, análisis de tejidos, modelos animales y estudios clínicos sobre la AR, apuntan hacia una **etiología inmunomediada** asociada con desregulación del tejido estromal que conducen a la cronificación de la inflamación y la destrucción articular (Firestein y McInnes 2017). Basándonos en la variedad de respuestas clínicas a diversos agentes terapéuticos que tienen como diana distintos elementos del sistema inmune evidenciamos que la AR, más que una entidad única, es un síndrome con un fenotipo clínico común pero que surge de distintas vías que, a su vez, pueden mostrar solapamiento entre sí (Firestein 2014). Así, la AR se caracteriza por la desregulación de la **respuesta inmune innata** (activación del complemento mediante inmunocomplejos, ICs), la **respuesta inmune adaptativa** contra antígenos "propios" (predominantemente ante proteínas modificadas postraduccionalmente), la **desregulación de redes de citocinas** y la activación de osteoclastos, condrocitos y células residentes de la articulación sinovial que contribuyen a la progresión de la enfermedad (Arend y Firestein 2012, Firestein y McInnes 2017).

Una de las primeras pistas que condujo a la hipótesis de que la AR era una enfermedad autoinmune fue el descubrimiento del **factor reumatoide** en la sangre de pacientes con AR. Se trata de un autoanticuerpo que se une a la región constante (Fc) de la IgG y que fue observado por primera vez por E. Waaler en 1939 (Waaler 1940) y confirmado por H.M. Rose unos años más tarde (Rose et al. 1948). Su papel en la patogénesis de la AR se explicará más adelante con mayor detenimiento.

Como se expuso anteriormente, existe una sólida relación entre la AR y el sistema **HLA-II** a través del denominado **epítipo compartido**, apuntando a una clara e importante implicación de las **células T** en la patogenia de la AR. Estudios recientes han identificado aa adicionales localizados en la base de la zona de unión (hendidura) del antígeno (Raychaudhuri et al. 2012). Los alelos de riesgo, sobre todo los que determinan ciertas variantes aminoacídicas que se localizan en zonas profundas de la hendidura, podrían incrementar el riesgo de presentación de **antígenos artrítogénicos**, como las **proteínas citrulinadas** (Firestein y McInnes 2017). Un ejemplo de este hecho es que el HLA-DR presenta una unión de mayor avidez por la vimentina citrulinada que por el péptido nativo (no citrulinado) (Law et al. 2012). A pesar de que la citrulinación de proteínas en situaciones de estrés es un proceso común en las células de los mamíferos llevado a cabo por enzimas

PAD, la producción de anticuerpos contra esas proteínas sí supone un comportamiento diferencial de riesgo en el caso de la AR que permite, con el tiempo, la aparición de autorreactividad (Firestein y McInnes 2017). De este modo, los alelos HLA asociados a AR presentan de forma más eficiente los péptidos citrulinados a las células T provocando su activación y una mayor liberación de citocinas como la **IL-17** y el Interferón- γ (**IFN- γ**) que cuando se les presenta el péptido nativo. Además, la **respuesta inmune adaptativa** frente a la presencia de péptidos citrulinados se caracteriza por la formación de otro tipo de autoanticuerpos, los ya mencionados **ACPA**, presentes en un **80-90%** de los pacientes con AR (Firestein y McInnes 2017) con una importante implicación en la patogénesis de la enfermedad que analizaremos más detalladamente a continuación.

En la actualidad, nuevos péptidos diana para otros tipos de alteraciones postraduccionales, tales como la **carbamilación** y la **acetilación**, se han vinculado con la AR a través de la detección de los correspondientes autoanticuerpos. Tal es el caso de los anticuerpos contra las proteínas carbamiladas (**anti-CarPs**) presentes en una minoría de pacientes con AR, incluyendo a un 30% de pacientes ACPA negativos (Shi et al. 2014) y los anticuerpos contra vimentina acetilada (Juarez et al. 2016).

No obstante, todo ese sistema de autoanticuerpos normalmente no conduce *per se* a la enfermedad inflamatoria articular, por tanto, parece que se requiere un “**segundo golpe**” cuya naturaleza es desconocida pero que se produciría a nivel de la **articulación** (una infección, un micro-trauma, etc.). Así, se activarían células de la inmunidad innata presentes en la sinovia, tales como los mastocitos, que liberarían mediadores vasoactivos permitiendo un mayor flujo de autoanticuerpos hacia la articulación. Es igualmente posible que una cascada de este tipo se inicie como consecuencia de la activación de los TCRs (Catrina et al. 2016b, Firestein y McInnes 2017). Estudios recientes han sugerido un posible reconocimiento de epítomos de membrana de los **osteoclastos (OC)** por parte de los ACPA, promoviendo el proceso de osteoclastogénesis (Harre et al. 2012) y la liberación de **CXCL-8** que contribuye al reclutamiento de leucocitos y al establecimiento de un círculo vicioso de inflamación en la articulación (Krishnamurthy et al. 2016).

En el momento en que se instaura la enfermedad a nivel articular, se produce la formación de inmunocomplejos por parte de los autoanticuerpos, la activación del Complemento, la liberación de fragmentos quimiotácticos y se inicia una cascada de eventos que activa a células residentes de la articulación provocando, a su vez, el reclutamiento de nuevas células del sistema inmune, tanto innato como adaptativo (Tan y Smolen 2016). Así, se establece una producción de citocinas y quimiocinas que provocan la retroalimentación del proceso y con ello la perpetuación del mismo. En este contexto cabe desatacar el **microambiente** de

la articulación, que la convierte en especialmente vulnerable a este bucle debido a la porosidad de sus vasos sanguíneos y a que la capa íntima de la membrana sinovial está constituida por sinoviocitos (tipo fibroblasto y tipo macrófago) que no establecen uniones estrechas entre sí. Ambas características facilitan el ingreso de células y de proteínas al interior (Firestein y McInnes 2017) (Fig. 4).

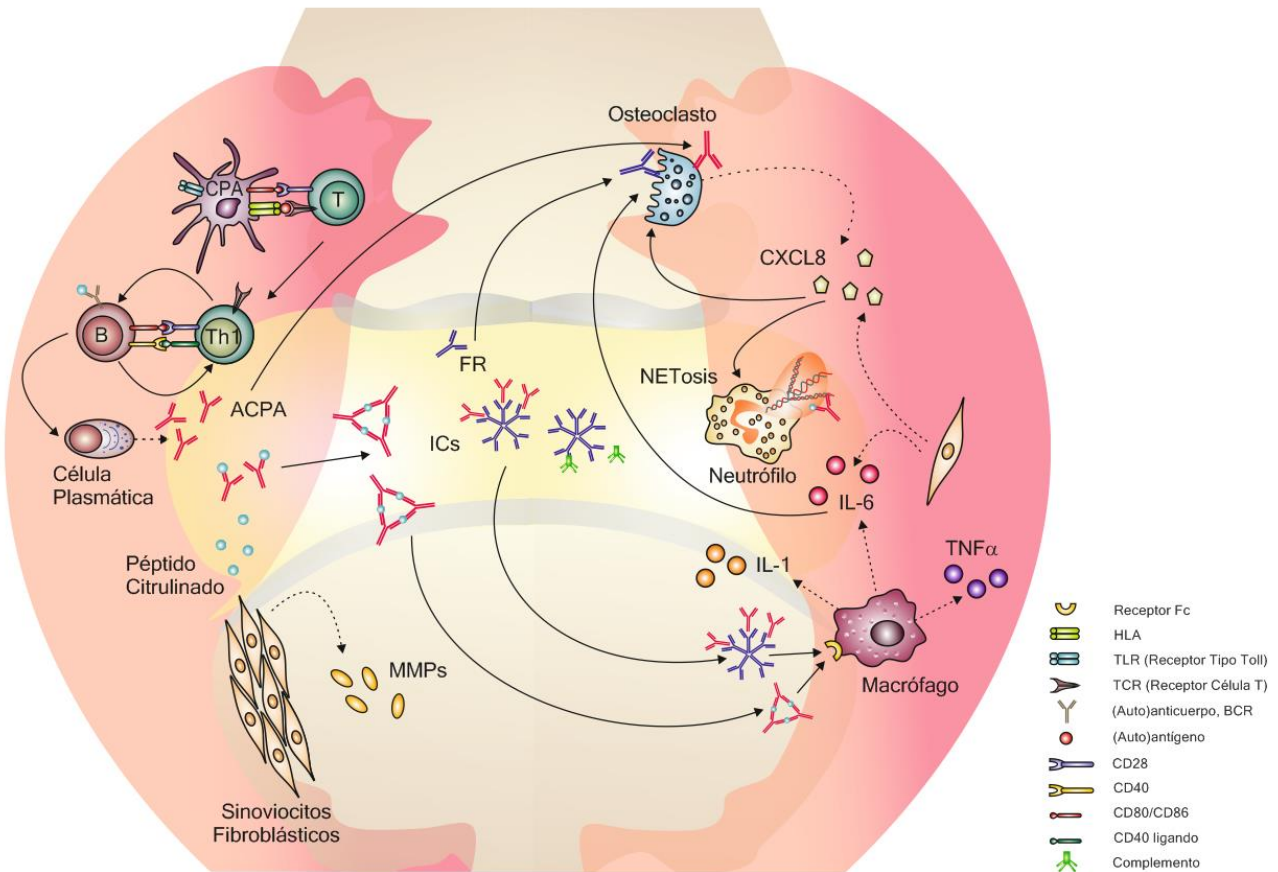


Figura 4. Patogénesis de la AR.

2.3.1.1. AUTOANTICUERPOS EN LA AR: POTENCIAL PATOGENICO DEL FR Y LOS ACPA

Como hemos visto, uno de los rasgos más característicos de la AR es la presencia de autoanticuerpos, de entre los cuales, los más relevantes por su papel en la patogénesis de la enfermedad y en el diagnóstico de la misma son el factor reumatoide y los anticuerpos contra proteínas citrulinadas.

El potencial patológico del **FR** residiría en su capacidad para formar **inmunocomplejos** (ICs) (Mannik 1992) que se unirían al sistema del **Complemento** produciendo la liberación de factores **quimiotácticos** como **C5a**. El gradiente quimiotáctico atraería a células inflamatorias, principalmente **neutrófilos**, hacia la articulación donde serían activadas y contribuirían a la destrucción local (Jose et al. 1990). Adicionalmente, la otra porción de la

proteína C5 del Complemento forma el complejo C5b-C9, llamado **complejo de ataque a membrana** o **MAC** (*membrane attack complex*) que daña la integridad de la membrana de dichas células (Romero et al. 2013).

Tan y Smolen proponen una hipótesis interesante para explicar la iniciación de la AR como un bucle de activación reiterada del Complemento mediada por distintos tipos de ICs (Tan y Smolen 2016). De acuerdo con esta hipótesis, el “primer golpe” consistiría en la formación de ICs entre antígenos de agentes infecciosos y los correspondientes anticuerpos. Esta primera línea de ICs activaría el Complemento liberando anafilotoxinas y mediadores inflamatorios. Estos mismos ICs podrían ser reconocidos como antígenos del FR formando nuevos ICs que constituirían el “segundo golpe” reiniciando el ciclo de activación del Complemento y con ello la exacerbación y perpetuación de la inflamación en la cavidad sinovial. Además, ICs adicionales podrían formarse como resultado de la unión del FR a ICs formados por los ACPA unidos a su vez a sus antígenos citrulinados.

Esta hipótesis se ve apoyada por distintas evidencias clínicas y experimentales que destacan el papel del FR por encima del de los ACPA. Por un lado, se ha observado que en pacientes con AR el FR determina mayor actividad basal de la enfermedad independientemente del estatus de los ACPA (Aletaha et al. 2015). Adicionalmente, el FR se asocia a mayor progresión de las erosiones óseas (Aletaha et al. 2013) pudiendo deberse a que los ICs promueven la osteoclastogénesis a través del incremento de producción de factor de necrosis tumoral (TNF) por parte de los macrófagos.

Sin embargo, la producción del FR en individuos sanos y en otras enfermedades crónicas inflamatorias indicaría que su mera presencia no es suficiente para explicar la respuesta patológica en la AR.

La **coocurrencia** de positividad para el **FR** y los **ACPA** en la AR está ampliamente descrita, si bien, los mecanismos subyacentes de la potencial **interacción** entre ambos aún están por dilucidar. Recientemente se ha descrito que la presencia combinada de ACPA y FR (isotipo IgM) promueve una mayor producción de citocinas proinflamatorias *in vitro* y se asocia con mayor inflamación sistémica y actividad de la enfermedad en la AR (Sokolove et al. 2014). Al parecer, la conexión entre ambos autoanticuerpos consiste en que el FR-IgM aumenta la patogenicidad de los ACPA haciendo que sus ICs tengan mayor capacidad de estimular la producción de citocinas por parte de los macrófagos. Por otra parte, la presencia de **C5a** en la sinovia en respuesta a la activación del Complemento debida a la formación de ICs por parte del FR, conduce a un proceso de **neutrofilia**. Los neutrófilos, que poseen en el citosol enzimas PAD, pueden llevar a cabo la **hipercitrulinación** de sus propias proteínas (Zhou et

al. 2015b) produciendo grandes cantidades de antígenos que estimulan respuestas de los anticuerpos correspondientes. Así, encontramos un nexo entre el **FR** y los **ACPA** en el proceso de **NETosis**¹. Las trampas extracelulares de neutrófilos o **NETs** (*neutrophil extracellular trap*) están implicadas en varias enfermedades autoinmunes y una investigación reciente de Kaplan y cols. apunta a que la producción de estas redes está **incrementada en pacientes con AR** y provocan la liberación de una mayor cantidad de autoantígenos citrulinados, implicados en la patología (Khandpur et al. 2013). En este estudio comprobaron que las redes producidas por los neutrófilos en pacientes con AR contienen gran cantidad de **vimentina citrulinada** que es reconocida por los **ACPA**. Así mismo, las NETs proporcionan también la **histona H4 citrulinada** que resulta ser un nuevo antígeno reconocido por ellos (Pratesi et al. 2014). Así, se formarían más ICs que retroalimentarían el proceso y, adicionalmente, citocinas proinflamatorias como la IL-17 y el TNF elevadas en la AR, promoverían la formación de NETs potenciando el bucle.

La fuerte asociación que existe entre la AR y la presencia de los ACPA sugiere un papel destacado de estos anticuerpos en la patogénesis de la enfermedad. Al parecer su **capacidad patogénica** depende de un proceso de maduración en el cuál se producen cambios en relación con el perfil de reconocimiento de epítomos, los isotipos, la avidez y el patrón de glicosilación (Bax et al. 2014). Por un lado, ya hemos visto su implicación en la **NETosis** y la perpetuación de la enfermedad. Por otra parte, se les atribuyen importantes funciones efectoras. En primer lugar se ha observado *in vitro* su capacidad para **activar el sistema del Complemento**, tanto por la vía clásica como por la alternativa, originando la formación del MAC y la liberación de C5a (Trouw et al. 2009). Además, los ICs formados por ACPA tienen un gran potencial inflamatorio gracias a su **unión al receptor Fc** de la superficie de los macrófagos, activándolos con la consiguiente producción de **TNF** (Clavel et al. 2008). Finalmente, se ha observado una fuerte asociación entre la presencia de los ACPA y marcadores séricos de resorción ósea en pacientes con AR. Es más, anticuerpos anti-vimentina citrulinada humana transferidos a ratón condujeron a la osteopenia y la osteoclastogénesis (Harre et al. 2012). En pacientes con AR se ha observado además que el efecto de estos anticuerpos en la pérdida de hueso varía en función de cómo disminuya su **avidez** por los distintos antígenos. Así, los ACPA con baja avidez se asocian a una mayor tasa de destrucción articular, seguramente debido a que tiene mayor capacidad de interacción

¹ La NETosis es una nueva forma de muerte celular descrita por el Dr. Brinkmann en 2004 al observar que los neutrófilos estimulados por la presencia de hongos y bacterias producen redes (NETs) de proteínas intracelulares del propio neutrófilo (cromatina nuclear y ADN) para atrapar a esos agentes patógenos antes de morir (Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch y A. Zychlinsky (2004). *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science 303(5663): 1532-1535.)

con más antígenos citrulinados a la vez y a que son más potentes en la activación del sistema del complemento (Suwannalai et al. 2014).

Estos datos en su conjunto indican que la etiopatología de la AR difiere en virtud de que los individuos sean ACPA⁺ o ACPA⁻; a pesar de lo cual la presentación clínica de la enfermedad en el momento del diagnóstico es semejante. Sin embargo, un estudio reciente revela que en efecto existen diferencias fenotípicas en la fase pre-sintomática de la AR, apoyando la idea de que en ambos grupos de pacientes la enfermedad se desarrolla de forma diferente (Burgers et al. 2017).

2.3.2. LA INFLAMACIÓN DE LA MEMBRANA SINOVIAL

La **sinovitis** consiste en la inflamación de la membrana sinovial que reviste las articulaciones aportándoles lubricación y nutrientes. En condiciones normales esta membrana es relativamente acelular y puede dividirse en 2 capas. En contacto con la cavidad articular se encuentra una fina cubierta de unas 2 o 3 capas de **FLS** con sinoviocitos de tipo macrofágico (**MLS**, *macrophage-like synoviocyte*) dispersos y escasos vasos sanguíneos, conocida como **íntima sinovial** o *lining*. En un nivel más profundo se encuentra la capa **subíntima** o *sublining* formada por tejido conectivo vascularizado e innervado (Bartok y Firestein 2010, Smith 2011). Los FLS, en la sinovia sana, constituyen un 75% del total de células y tienen como función la secreción de los componentes del líquido sinovial (lubricina y ácido hialurónico) y de la matriz extracelular (proteoglucanos, fibronectina y colágeno).

Se ha observado que en individuos con autoinmunidad sistémica asociada a AR, pero aún sin sintomatología (pre-AR), no existen todavía signos inflamación sinovial y el infiltrado de células T es muy sutil (de Hair et al. 2014). Sin embargo, en el momento en que comienza a manifestarse la enfermedad, con hinchazón en las articulaciones, la sinovia comienza a sufrir modificaciones. La membrana sinovial sufre una **hiperplasia** (10-12 capas celulares de FLS y MLS) y se produce una **infiltración de células** características de la respuesta inmune innata (macrófagos, células dendríticas, natural killer, mastocitos, etc.) y adaptativa (linfocitos T y B y células plasmáticas). Así mismo se observan procesos de **neovascularización** y, aunque no tan abundante, linfoangiogénesis (Firestein y McInnes 2017) (Fig. 2).

2.3.2.1. *SINOVIOCITOS FIBROBLÁSTICOS EN LA SINOVITIS*

Entre las células residentes de la articulación sinovial más relacionadas con la patogénesis de la AR encontramos a los sinoviocitos tipo fibroblasto. Múltiples estudios destacan la **agresividad** de su fenotipo y de su **potencial destructivo**, que persisten en el tiempo al margen de la respuesta del sistema inmune y del ambiente articular (Muller-Ladner et al. 1996, Bottini y Firestein 2013) pudiendo implicarse tanto en el inicio como en la exacerbación de la enfermedad. Además de su participación en la destrucción de las estructuras articulares, los FLS podrían **presentar péptidos** de autoantígenos presentes en la articulación, como el colágeno tipo II, actuando como una “subpoblación” de células presentadoras de antígenos (**CPA**) y contribuyendo así a la respuesta inmune autorreactiva local (Tran et al. 2007). Además, estos FLS de fenotipo semiautónomo, se caracterizan por la pérdida de la inhibición por contacto y por la elevada expresión de citocinas y quimiocinas implicadas en la patogénesis, moléculas de adhesión, así como de **MMPs** (metaloproteinasas de matriz extracelular) y otras enzimas que degradan el colágeno y otros componentes de la matriz (McInnes y Schett 2011, Firestein y McInnes 2017).

La destrucción articular en forma de **erosión del cartílago** es una de las señas de identidad de la AR y, en este contexto, los FLS parecen desempeñar una función importante a través de la liberación de **MMP1** y **MMP3** y citocinas como **IL-1**, **TNF** e **IL-17**, que causan daño directo en el cartílago, así como mediante la activación de condrocitos y de procesos catabólicos en el tejido (Firestein y McInnes 2017). Recientemente se ha propuesto la existencia de **subpoblaciones** de FLS distintas en cuanto a su comportamiento y su perfil de citocinas, observándose que la subpoblación caracterizada por la expresión de **podoplanina** parece ser la asociada al proceso de erosión del cartílago (Croft et al. 2016). Adicionalmente, los FLS son la fuente principal de **IL-6** en la articulación sinovial artrítica, que junto con otras citocinas acumuladas en el microambiente articular, como **BAFF** (*B-cell activatig factor*) y **APRIL** (*a proliferation inducing ligand*), promueven la maduración, diferenciación y activación de los **linfocitos B** responsables de la autorreactividad local (Bombardieri et al. 2011). Además, se ha observado que los FLS en AR presentan alteraciones en la expresión de protooncogenes y genes supresores de tumores como **c-Fos**, **PTEN** y **p53**, confiriéndoles la capacidad de hiper-proliferación e invasión de los tejidos adyacentes (Harre y Schett 2017). Finalmente, un estudio reciente describe cómo los FLS sufren dos cambios funcionales a lo largo de la evolución de la enfermedad. En etapas tempranas presentan una pérdida de sus funciones inmunosupresoras y en una segunda etapa adquieren un fenotipo estimulador. También resulta muy interesante la descripción de cómo los FLS exhiben un fenotipo de transición funcional durante los tres primeros

meses, desde la presentación de los síntomas, contribuyendo a la acumulación de infiltrados persistentes (Filer et al. 2017).

2.3.2.2. **MACRÓFAGOS EN LA SINOVITIS**

En la membrana sinovial existe un segundo tipo celular con el cuál los FLS establecen interacción y una activación recíproca: los sinoviocitos macrofágicos, **MLS**. El fenotipo predominante es el de **macrófago proinflamatorio-M1**, que se caracteriza por la liberación de citocinas como el TNF, interleucinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23), quimiocinas, péptidos vasoactivos, MMPs e intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno; así como por llevar a cabo procesos de presentación antigénica y fagocitosis (McInnes y Schett 2011, Firestein y McInnes 2017). Las vías mediante las cuales se produce la activación de los macrófagos son diversas, incluyendo los receptores tipo Toll y tipo NOD (NLRs), pertenecientes a la superfamilia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que reconocen gran número de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (McInnes y Schett 2011). Por otro lado, su activación también puede ser desencadenada por derivados de colesterol como el LDL, la presencia de proteasas solubles (a través del receptor PAR2) y de inmunocomplejos, principalmente formados por FR o por ACPA, dado que los macrófagos presentan una elevada expresión de sus receptores FcγR1 y FcγR3 (Firestein y McInnes 2017).

2.3.2.3. **CÉLULAS T EN LA SINOVITIS**

Numerosas evidencias apoyan el papel clave de las **células T** tanto en el inicio como en la perpetuación de la AR. Por un lado, los principales **modelos animales** de esta enfermedad, como la artritis inducida por colágeno (**CIA**, *collagen induced arthritis*) y la artritis inducida por antígeno (**AIA**, *antigen induced arthritis*) son dependientes de células T (Asquith et al. 2009). Por otro lado, desde el punto de vista inmunogenético, recordemos la susceptibilidad a la enfermedad que presentan los portadores de según qué variantes de HLA-DR. Además, el éxito terapéutico del agente biológico **Abatacept (ABT)**, una proteína de fusión CTLA4-IgG-Fc que bloquea de forma específica la co-estimulación de las células T a través de la interacción con CD28, CD80 o CD86, muestra clara evidencia de su implicación patogénica (Cope et al. 2007, McInnes y Schett 2011, Herrero-Beaumont et al. 2012, Pietrosimone et al. 2015).

En el infiltrado inflamatorio característico de la articulación sinovial artrítica existe un porcentaje elevado de células **T CD4⁺ activadas**. Estas células poseen una gran **plasticidad** fenotípica que les permite diferenciarse a distintas subpoblaciones de células Th adaptando

sus funciones para combatir de forma específica estímulos patogénicos. Sin embargo, esa plasticidad puede resultar también deletérea conduciendo a respuestas inmunes patológicas (DuPage y Bluestone 2016). En la [figura 5](#) se representan de forma esquemática las principales **subpoblaciones de células Th**, indicando las señales extracelulares que conducen a su diferenciación y las cascadas de señalización citosólicas y nucleares generadas, que modifican los patrones de expresión génica, así como las principales funciones que desempeñan.

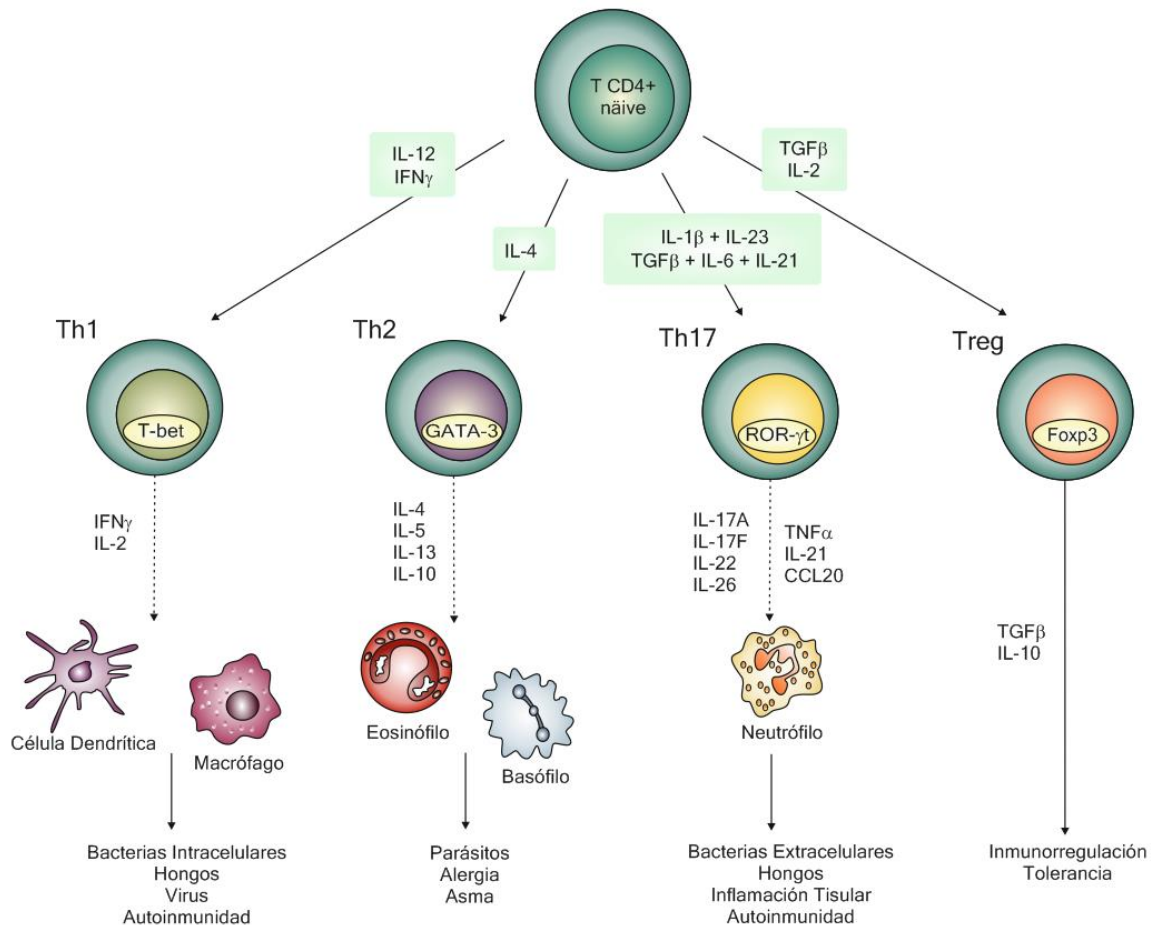


Figura 5. Diferenciación de las células T en distintas subpoblaciones de T helper: se indican las citocinas y factores de transcripción implicados en la diferenciación así como las citocinas y funciones que caracterizan a cada una de las subpoblaciones resultantes.

Clásicamente, la artritis reumatoide se consideraba una enfermedad mediada por células T de **tipo Th1**, sin embargo, desde hace unos años la atención se ha focalizado en la subpoblación **Th17** dadas las consistentes evidencias de su papel clave en modelos animales de AR (Miossec y Kolls 2012, Lubberts 2015). En humanos, las conclusiones no son tan firmes aún, dado que los fármacos terapéuticos dirigidos a la inhibición de la IL-17 y de su receptor no han sido particularmente eficaces en ensayos clínicos de AR, a pesar de

haber conseguido cierta respuesta en psoriasis y en algunas espondiloartropatías. Recientemente se ha sugerido la hipótesis de que las células Th17 tengan un papel importante durante la fase pre-AR pero que no se manifiesten en etapas efectoras de la enfermedad (Firestein y McInnes 2017). La diferenciación de esta subpoblación celular está mediada por la presencia de factor de crecimiento transformante β (**TGF- β**) derivado de macrófagos y de células dendríticas (CD) , así como por **IL-1**, **IL-6**, **IL-21** e **IL-23** que, al mismo tiempo, suprimen la diferenciación de las células T reguladoras (**Treg**), desplazando el balance homeostático de los linfocitos T hacia la inflamación (McInnes y Schett 2011). De hecho, estudios en tejidos de pacientes con AR muestran una reducción en el número y la funcionalidad de las células Treg de la sinovia en comparación con las de sangre periférica y líquido sinovial y ese desequilibrio local podría ser responsable de los episodios reiterados de exacerbación de la enfermedad (Behrens et al. 2007). En tal caso, el restablecimiento de ese equilibrio supone una atractiva diana terapéutica. Por su lado, las Th17 se caracterizan por la producción de interleucinas **17A**, **17F**, **21** y **22** y de **TNF**, existiendo una actuación sinérgica entre la IL-17A y el TNF que promueve la activación de los fibroblastos y condrocitos articulares. La actuación patogénica de las Th17 implica además otras vías no-antígeno-específicas como es el caso de la activación de fibroblastos y macrófagos mediada por contacto con las células T a través de CD40-CD40 ligando, CD200-CD200 ligando, etc. (McInnes y Schett 2011). Los antiguos modelos que explicaban con rigidez el proceso de diferenciación de las células T han dado paso al reconocimiento de la **plasticidad fenotípica** que existe entre subpoblaciones T. Tal es el caso de la potencial intercambiabilidad entre las células Th1, Th17 y Treg. Precisamente la inestabilidad/plasticidad de las Th17 que les confiere su carácter patogénico/no patogénico es la que las convierte en diana terapéutica en enfermedades inflamatorias como la AR (Gagliani et al. 2015) (**Fig. 6**). De hecho, datos recientes de nuestro grupo sugieren una contribución Th17 predominante en la AR temprana, observándose en estas células un mayor fenotipo patogénico y mayor perfil Th17/Th1 que en células de donantes sanos (Jimeno et al. 2015a, Jimeno et al. 2015b).

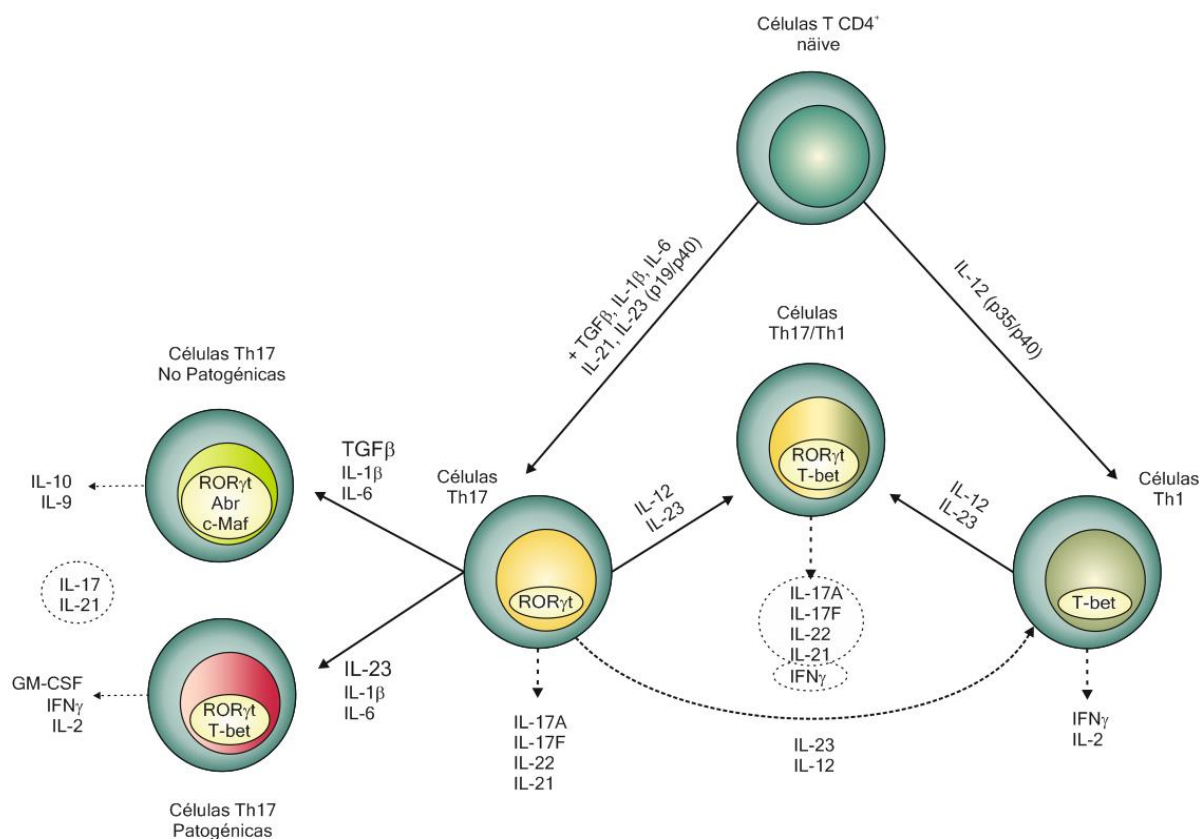


Figura 6. Plasticidad de las células Th1/Th17 y fenotipos Th17 patológico/no patológico: citocinas y factores de transcripción implicados.

2.3.2.4. **CÉLULAS B EN LA SINOVITIS**

La **respuesta adaptativa humoral**, con la producción de **autoanticuerpos**, es una de las marcas de identidad de la AR y, por tanto, las **células B** juegan un papel clave en la patogénesis de la enfermedad. En la sinovia encontramos estas células en sus distintos estadios de desarrollo, en la mayoría de los casos en forma de agregados de células T-B, incluyendo los plasmablastos y las células plasmáticas maduras, distribuidas de forma más amplia por la articulación. Esto se debe a que la articulación sinovial proporciona un entorno rico en citocinas como las mencionadas **APRIL**, **BAFF**, **BLyS** (*B lymphocyte stimulator*) y en quimiocinas de tipo **CC** y **CXC** que favorecen su supervivencia y maduración (McInnes y Schett 2011, Firestein y McInnes 2017). La importante intervención de las células B en la patogenia de la AR queda patente en la eficacia confirmada de terapias biológicas como el **Rituximab (RTX)**, un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra la molécula CD20 expresada por estas células durante su proceso de maduración. Su éxito abrió camino a otras estrategias terapéuticas basadas en la depleción o no-depleción de las células B con diana en otras moléculas como CD22, CD19 o CD52, así como en la modulación

de su señalización y en la actuación sobre las células B reguladoras (**Breg**) (Burmester et al. 2014). Sin embargo, la intervención de los linfocitos B en la AR va más allá de la mera producción de autoanticuerpos, atribuyéndoles un papel importante en procesos de **presentación antigénica** local, producción de **citocinas** como IL-6, TNF y linfotóxina- β (McInnes y Schett 2011) y en la formación de estructuras linfoides ectópicas que se asocian a mayor progresión de la erosión (Firestein y McInnes 2017). Por último, un estudio reciente de Meednu y cols. apunta hacia un papel clave de las células B en la **homeostasis de hueso** y en la destrucción articular a través de la producción de **RANKL** (*receptor activator for nuclear factor κ B ligand*), una citocina esencial para el desarrollo de los osteoclastos (Meednu et al. 2016).

2.3.3. ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN LA AR

El daño estructural producido con la progresión de la artritis se plasma en forma de **pérdida del cartílago** y **erosión del hueso**. El resultado de ambos procesos es la **destrucción de la articulación** sinovial, una de las consecuencias más graves de la enfermedad. En el microambiente inflamatorio de la articulación se produce la activación de los **osteoclastos** y la transformación de los **FLS** hacia fenotipos destructivos, siendo ambos tipos celulares, altamente influenciados por el sistema inmune, los responsables de la degradación de hueso y cartílago respectivamente (Harre y Schett 2017).

2.3.3.1. DESTRUCCIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR EN LA AR

La **hiperplasia** de la membrana **sinovial** es la principal contribuyente al **daño** en el **cartílago**. La transformación de los **FLS** en células con un comportamiento de tipo tumoral hace que proliferen y migren invadiendo el cartílago, adhiriéndose a él gracias al incremento de expresión de moléculas de adhesión (Bartok y Firestein 2010). De hecho se ha definido la formación de una estructura tipo podosoma por parte de los FLS, denominada **invadosoma**, rica en integrinas, actina F y proteasas (Harre y Schett 2017). Concretamente, los FLS liberan **MMP1, 3 y 13** que degradan los **proteoglicanos** de la matriz extracelular y con ello alteran el contenido del medio en **glucosaminoglucanos**, provocando la retención de agua que lleva a la disfunción mecánica; así mismo, liberan **catepsinas K y L**, que desmontan la **red de colágeno** tipo II (Cawston y Young 2010, Conus y Simon 2010, Sabe et al. 2010). Los FLS también liberan otras enzimas de matriz extracelular como las **ADAMTS** (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) que degradan el **agrecano** contribuyendo a la pérdida de integridad del cartílago (Yamanishi et al. 2002).

El cartílago cuenta con sistemas de protección endógenos, como los **TIMPs** (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) o inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, que no son

suficientes para contrarrestar la cascada de destrucción, o los propios **condrocitos**, que en condiciones normales regulan la formación-destrucción de cartílago pero que bajo la influencia de citocinas proinflamatorias como la IL-1 y la IL-17 entran en apoptosis (McInnes y Schett 2011, Harre y Schett 2017).

2.3.3.2. EROSIÓN ÓSEA EN LA AR

La **destrucción del hueso** en la articulación sinovial se produce en respuesta a la elevada y prolongada inflamación, afectando a un 80% de los pacientes durante el primer año de enfermedad (McInnes y Schett 2011) (Fig. 7).

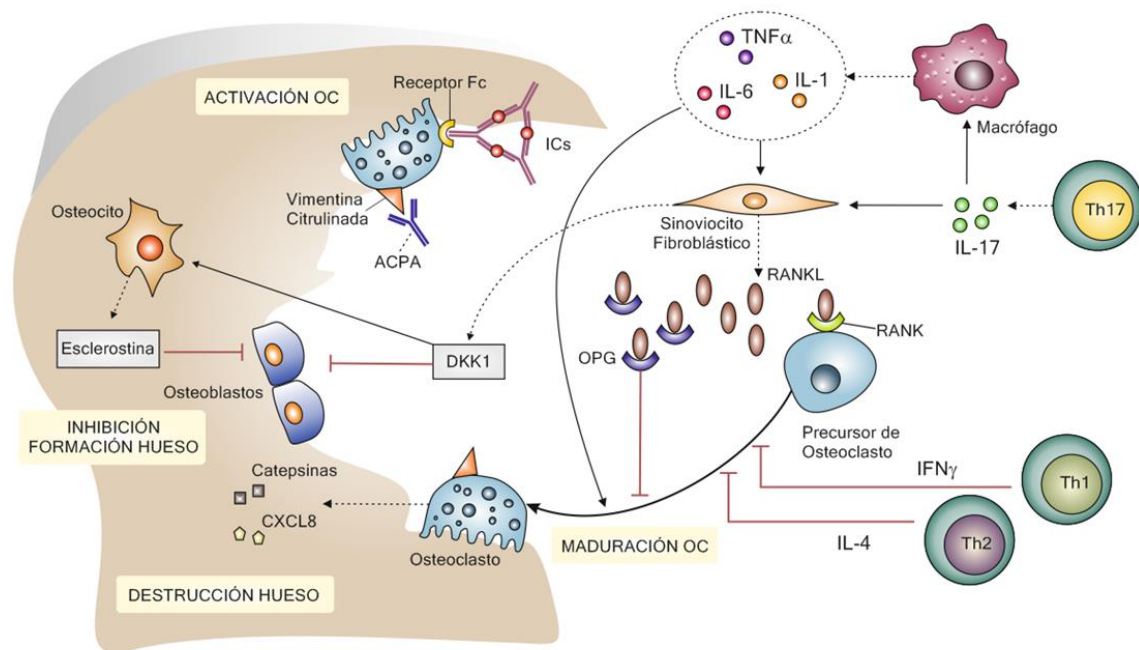


Figura 7. Alteración de la homeostasis en el hueso inducida por la sinovitis en la AR.

Las citocinas presentes en la sinovia, especialmente **M-CSF** (*macrophage colony-stimulating factor*) y **RANKL** (con amplificación del fenómeno mediante IL-1, IL-6 e IL-17) promueven la supervivencia, diferenciación y activación de los osteoclastos que invaden y destruyen el cartílago formando cavidades que son rellenas por tejido inflamatorio (osteítis). Los OC cuentan con una maquinaria enzimática que además es capaz de destruir tejido mineralizado, como es el caso del hueso subcondral pudiendo originar brechas en el hueso estableciéndose comunicación entre la cavidad sinovial y la médula ósea (McInnes y Schett 2011, Harre y Schett 2017). Quizás este hecho ha permitido hipotetizar un posible origen de la AR en el interior de la médula ósea, de tal modo que elementos mesenquimales migrarían desde la médula infiltrándose en la sinovia, proporcionando el estímulo inicial para la subsecuente inflamación articular (Schett y Firestein 2010).

La unión de **RANKL** a su receptor (**RANK**) en la superficie de los osteoclastos, conduce a la activación de factores de transcripción como **NF-κB**, **c-Fos** y **NFATc1**. Este último aumenta la expresión de genes osteoclastogénicos como la fosfatasa ácida tartrato resistente (**TRAP**), la catepsina K o el receptor de calcitonina (Crotti et al. 2015).

El mantenimiento de la homeostasis en el hueso implica la **resorción ósea**, por parte de los osteoclastos, en zonas dañadas. En dicha situación fisiológica, la secreción de RANKL por parte de osteoblastos y osteocitos es contrarrestada con la liberación de **osteoprotegerina** (OPG) por los osteoblastos. La OPG es un receptor soluble de RANKL que actúa como su antagonista, de tal modo que el mantenimiento de la ratio **RANKL/OPG** es clave para la **homeostasis** de la formación y activación de los OC. En las articulaciones sinoviales inflamadas, las células residentes (principalmente los FLS) e infiltrantes (linfocitos T, B, etc.) de la sinovia provocan un gran incremento de esa ratio y con en ello la ruptura del equilibrio en favor de la destrucción del hueso (Harre y Schett 2017).

Sin embargo, la explicación del daño óseo como consecuencia únicamente del proceso inflamatorio dejaba muchas incógnitas abiertas, sugiriendo la existencia de otros mecanismos. Por un lado, el hecho de que pacientes con AR de reciente comienzo muestren ya signos de daño óseo cuando la inflamación acaba de iniciarse sugiere un elemento causal previo a la inflamación y sabemos que los autoanticuerpos sí están presentes en el organismo muchos años antes del inicio de la enfermedad. Por otro lado, los pacientes con AR que son seropositivos sufren lesiones óseas mucho más severas que los pacientes seronegativos. Finalmente, los pacientes tratados con FAMEs (fármacos modificadores de la enfermedad) sintéticos, aun entrando en remisión continúan sufriendo progresión del daño óseo. Todos estos hechos en conjunto llevaron a la asunción del **papel clave de los autoanticuerpos** en el proceso de destrucción del hueso (Harre y Schett 2017, Schett 2017). Recientemente se han descrito dos mecanismos de acción para esta vía osteoclastogénica. El primero de ellos describe que los **inmunocomplejos** resultantes de la unión de los autoanticuerpos a sus antígenos, se unirían al receptor **Fc** de la membrana de los OC conduciendo a su activación (Grevers et al. 2013). El otro posible mecanismo está relacionado con la formación de anticuerpos **anti-vimentina citrulinada** que se expresa de forma elevada en la superficie de los OC convirtiéndolos en perfectas dianas antigénicas para los ACPA, que se unirían a ellos activándolos (Harre et al. 2012).

2.3.4. CITOCINAS EN LA AR

La producción de **citocinas** llevada a cabo por múltiples poblaciones celulares presentes en la articulación sinovial es otro punto clave en la patogénesis de la AR (Tabla 2).

En la articulación artrítica, el **desequilibrio** de los componentes **anti y proinflamatorios** de una compleja red de citocinas y quimiocinas induce y/o agrava la respuesta inflamatoria mediante la activación de células endoteliales, el reclutamiento de células del sistema inmune, el fomento de la autoinmunidad y el daño articular (McInnes y Schett 2007, Smolen et al. 2016a). El conocimiento de la **jerarquía** que opera en esta red es un paso clave en el desarrollo de estrategias para controlar la enfermedad. De hecho, es considerable el éxito clínico de las **terapias de inhibición de citocinas**, especialmente en el caso de la **IL-6** y el **TNF**; actualmente, se analizan nuevos posibles candidatos que impulsen el componente tisular de la enfermedad y que puedan servir como nuevas dianas terapéuticas para lograr la remisión de los casos refractarios al tratamiento (McInnes et al. 2016). Los perfiles de citocinas observados en **distintas etapas** de la enfermedad difieren notablemente (entre pre-AR y AR establecida), así como se diferencian también entre los **compartimentos** sistémico y sinovial (McInnes y Schett 2011, McInnes et al. 2016).

El conjunto de células de la **inmunidad innata** presentes en la articulación sinovial, tales como macrófagos (residentes e infiltrados), neutrófilos (procedentes principalmente del líquido sinovial), mastocitos y células NK (*natural killer*) sufren una desregulación de su activación potenciada por la expresión de PAMPs y DAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos y a daño, respectivamente) (McInnes y Schett 2011). Esta desregulación conduce a la producción de enzimas destructivas, especies intermedias de nitrógeno y oxígeno, prostaglandinas y leucotrienos pero, sobre todo, a una amplia variedad de **citocinas efectoras** como las que veremos a continuación (McInnes et al. 2016).

El **TNF** es una citocina fundamental en la fisiopatología de la AR dado que prepara o media directamente en la activación leucocitaria, la adhesión y migración celular, la activación endotelial y la angiogénesis, la nocicepción, la expresión de quimiocinas, la activación de células del estroma y, conjuntamente con RANKL, activa la vía osteoclastogénica con la correspondiente destrucción del hueso (McInnes et al. 2016). Por otra parte, el TNF promueve la diferenciación de las células Th17 a través de la estimulación de la producción de IL-6 e IL-1 por parte de los monocitos presentes en la sinovia (Zheng et al. 2014). Sin embargo, esta citocina no está implicada únicamente en procesos patogénicos e inflamatorios sino que la señalización a través de su receptor se ve involucrada en procesos homeostáticos tales como la apoptosis y la necroptosis. Ese hecho implica que el bloqueo

global del TNF conlleve efectos tóxicos y estudios recientes apoyan la necesidad de bloquear de forma más específica su mecanismo patogénico (Kalliolias y Ivashkiv 2016).

La **IL-6** muestra un espectro de actuación bastante parecido al del TNF, pero dada su crucial participación en la enfermedad y su papel dual en respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas, la estudiaremos en profundidad más adelante.

Muchos miembros de la familia de la **IL-1** (incluyendo IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-36 e IL-32), actuando sinérgicamente con TNF están involucrados en la activación de vías efectoras que conducen a síntomas característicos de la AR, como es el caso de la activación de condrocitos y FLS o la producción de prostanoïdes. A nivel local promueven la vasodilatación y atraen a la zona a un mayor número de monocitos y neutrófilos, y son igualmente cruciales en la inducción de enzimas de destrucción de la matriz extracelular alterando el cartílago y la homeostasis ósea. Sin embargo, la falta de efectividad clínica observada tras su bloqueo, si bien no resta valor a su participación en el proceso sinovial, indica que no se encuentra en el origen de la cascada inflamatoria (McInnes et al. 2016, Schett et al. 2016).

Otras citocinas de los tipos I y II, como los interferones (**IFNs**) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (**GM-CSF**) ejercen funciones relevantes en la AR a través de la señalización por la vía JAK-STAT (Schwartz et al. 2016).

Por otro lado, encontramos las citocinas características de la **inmunidad adaptativa**, que ejercen gran variedad de funciones con una actuación de forma tanto paracrina como autocrina. La **IL-17A**, producida por las células Th17, estimula la liberación de TNF, IL-6 y GM-CSF, así como de quimiocinas (CXCL8, CCL20 y CCL2) y metaloproteinasas que participan en la degradación del cartílago. Además, estimula la angiogénesis, la activación de osteoclastos y promueve la supervivencia de los FLS, las células T y B. Su correlación con la severidad de la enfermedad y la presencia de ACPA no se ve acompañada por la efectividad de su bloqueo terapéutico, posiblemente a consecuencia del pleiotropismo en sus funciones y la redundancia con otras citocinas como TNF (Lubberts 2015, McInnes et al. 2016). La **IL-21** y otras citocinas como la **IL-7** y la **IL-15**, con las que comparte la cadena γ de su receptor, también se implican en procesos de maduración de los linfocitos B, la expansión y activación de células T y la estimulación del *crosstalk* entre linfocitos T y macrófagos en la sinovitis. Finalmente, la familia de la IL-12 aporta otros participantes a esta red; por un lado la **IL-23**, que estabiliza la expresión de IL-17 por parte de las Th17, y también la **IL-27** que promueve la diferenciación Th1 o la **IL-35**, con un papel importante en la generación de células Treg (Furst y Emery 2014, McInnes et al. 2016).

Tabla 2. Principales moléculas y mediadores implicados en la patogénesis de la AR.

	MEDIADOR	EXPRESIÓN ARTICULAR	FUNCIONES POTENCIALES EN LA PATOGENESIS DE LA AR
CITOCINAS	TNF	Monocitos, células T, B y NK, PMNs, mastocitos, FLS y osteoblastos	Activa leucocitos, células endoteliales y FLS induciendo la producción de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas de matriz; suprime la función reguladora de las células T; activa osteoclastos y la resorción de hueso y cartílago; media en la disfunción metabólica y cognitiva
	IL-1α y 1β	Monocitos, células B, FLS, condrocitos	Activa leucocitos, células endoteliales y FLS; induce la producción de enzimas de matriz por los condrocitos; activa osteoclastos; inductor de fiebre, la disfunción cognitiva y el incremento en el metabolismo de la glucosa
	IL-6	Monocitos, FLS, células T y B	Activa leucocitos y osteoclastos; participa en la diferenciación de células B; regula el metabolismo lipídico, la respuesta de fase aguda, la anemia y la fatiga en la enfermedad crónica
	IL-7 y 15	Monocitos, FLS, mastocitos, células B, PMNs, CD	Promueve y mantiene la activación de células T, NK y T de memoria; bloquea la apoptosis y mantiene las interacciones entre macrófagos y células T
	IL-17A y 17F	Células Th17, FLS	Actúan sinérgicamente para aumentar el estado de activación de FLS, condrocitos y osteoclastos
	IL-18	Monocitos, PMNs, CD, plaquetas, células endoteliales	Promueve la activación de células Th1, neutrófilos y células NK
	IL-21	Células TCD4 ⁺ naïve, Th17	Promueve la activación de células Th17 y células B
	IL-23	Macrófagos, CD	Promueve la expansión de células Th17
	IL-32	Células epiteliales, monocitos (ζ ?), FLS (ζ ?)	Activa la producción de citocinas por distintos leucocitos y promueve la diferenciación de los osteoclastos
	IL-10	Monocitos, células T y B, CD, células epiteliales	Disminuye y regula la respuesta inflamatoria de células T, CD y macrófagos; reduce la expresión de HLA y de moléculas coestimuladoras; contribuye a la maduración de células Treg; reduce la liberación de citocinas proinflamatorias y MMP por CD y FLS respectivamente
	TGFβ	FLS, monocitos, células T, plaquetas	Activa la proliferación de células Th17 y Treg; disminuye la proliferación y función efectora de las NK; activa a los macrófagos y la respuesta inflamatoria en etapas tempranas y posteriormente suprime dicha activación
	IFNs Tipo I	Amplia distribución	Aumenta la expresión de HLA; activa a los macrófagos; promueve la activación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos
FACTORES DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN	BLyS	Monocitos, células T	Activa a las células B y participa en su maduración y en el incremento en la producción de anticuerpos
	APRIL	Monocitos, células T	Activa a las células B y participa en su maduración y en el incremento en la producción de anticuerpos
	BAFF	Monocitos, células T, CD	Estimula la proliferación de las células B, la secreción de anticuerpos el cambio de isotipo y la supervivencia; participa en la co-estimulación T-B
	GM-CSF	Monocitos, FLS, células endoteliales, células T	Estimula la diferenciación de granulocitos y células del linaje mieloide tanto en la medula ósea como en la membrana sinovial. En células Th17 se relaciona con el perfil patogénico
	M-CSF	Monocitos, FLS, macrófagos activados	Estimula la diferenciación de granulocitos y células del linaje mieloide tanto en la medula ósea como en la membrana sinovial
	RANKL	Células estromales, osteoblastos, células T	Promueve la maduración y activación de los osteoclastos
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	VEGF	Monocitos, células endoteliales, FLS	Promueve la angiogénesis
	JAK	Amplia distribución	Tirosina cinasa que regula la maduración y activación de leucocitos mediada por citocinas, así como la producción de citocinas e inmunoglobulinas
	PI3K	Amplia distribución	Media en la señalización que conduce a la proliferación y supervivencia celular
	NF-κB	Amplia distribución	Media en la integración de la señalización inflamatoria y es importante para la supervivencia celular

(Adaptada de McInnes y Schett, 2007 y McInnes, 2011)

2.3.4.1. EL PAPEL DE LA **INTERLEUCINA 6** EN LA AR

La **Interleucina-6** fue identificada en 1986 por el grupo del Dr. Tadmitsu Kishimoto y pertenece a una amplia familia de citocinas que comparten el receptor de membrana **gp130**, mediador en la activación principal de la vía **JAK-STAT3** y colateral de las **MAPK** (quinasas activadas por mitógenos) y de **PI3K/Akt** (fosfatidil inositol cinasa), ejerciendo amplios efectos en la expresión de genes proinflamatorios e inmunoreguladores y en la supervivencia celular (Pablos Alvarez 2009, Rincon 2012, Calabrese y Rose-John 2014). Niveles normales de IL-6 son vitales para la **homeostasis** de los procesos inflamatorios dado que, en respuesta a una infección o lesión, su vía de señalización promueve y coordina las actividades proinflamatorias de células de todo el organismo. Sin embargo, niveles de IL-6 elevados de forma crónica, interrumpen la homeostasis provocando un estado inflamatorio crónico (Dayer y Choy 2010).

La implicación de la IL-6 en la AR queda evidenciada por la gran eficacia terapéutica de su bloqueo con **Tocilizumab (TCZ)**, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra su receptor (Tanaka et al. 2014). Estudios *in vitro* y *ex vivo* han demostrado que el TCZ, posteriormente a la inhibición de la IL-6, puede modificar el desequilibrio en las poblaciones Th observado en la AR. Concretamente parece inducir a la apoptosis de las células Th1, Th17 y Treg y promover la aparición de una respuesta tipo Th2 (Guggino et al. 2014). Además, se ha observado que en pacientes no respondedores a terapias de depleción de células B (Rituximab) los niveles de la IL-6 son mucho más elevados que en los respondedores. Estos pacientes se beneficiarían de una segunda línea de tratamiento con bloqueo de la IL-6 mediante TCZ antes que de una inhibición de la coestimulación de las células T (Abatacept) (Das et al. 2014).

A diferencia de otras citocinas estudiadas anteriormente, la IL-6 se caracteriza por una potente acción a nivel **sistémico** actuando en tres focos principales: sistema nervioso (respuesta febril), médula ósea (respuesta hematológica) e hígado (**respuesta de fase aguda**). De hecho, la vía de señalización de la IL-6 es el factor que más contribuye a la inducción de la **proteína C reactiva (PCR)** y otros reactantes de fase aguda (Calabrese y Rose-John 2014). Otra de sus características diferenciales es la capacidad de transmitir señal a través de dos mecanismos distintos: *cis* y *trans*. La **señalización clásica** o en *cis* la lleva a cabo mediante su unión al receptor de membrana **mIL-6R**, mientras que la señalización en *trans* la realiza a través de la forma soluble de su receptor, **sIL-6R**, con presencia en suero y líquido sinovial. De este modo la IL-6, una vez unida a uno de esos receptores, puede transmitir señal a cualquier célula que exprese el gp130, ejerciendo una

actividad biológica de **gran alcance** (Pablos Alvarez 2009, Dayer y Choy 2010, Brzustewicz y Bryl 2015). Los receptores de TNF e IL-1 también se expresan en forma soluble y de membrana, sin embargo, su señalización proinflamatoria solamente está mediada por el receptor unido a membrana y, por tanto, más restringida en cuanto a tipos celulares y localización (Colmegna et al. 2012). De hecho, ratones *knockout* (KO) para la IL-6 son inmunes al desarrollo de la AIA a pesar de que expresan cantidades normales de TNF e IL-1 (Choy 2004).

Tanto en el **suero** como en el **tejido sinovial** de los pacientes con **artritis** se detecta una **elevada** concentración de **IL-6** que, además, fluctúa rápidamente en sentido concordante a la **actividad** y **severidad** de la enfermedad, el **daño** radiológico y la respuesta positiva a las terapias (Dayer y Choy 2010). A nivel de la articulación sinovial se produce una síntesis excesiva de IL-6 llevada a cabo, sobre todo, por los **macrófagos** y por los **FLS**. Estos últimos producen IL-6 de forma ilimitada como consecuencia de una alteración fenotípica estable causada por la acción del TNF, la IL-1 (Bartok y Firestein 2010). Muchas de las células implicadas en la sinovitis (fibroblastos, sinoviocitos y condrocitos) no disponen del receptor de IL-6 en su membrana y, sin embargo, se ven afectados por esta citocina gracias a la ya mencionada presencia de la forma soluble del receptor en el medio articular (Hashizume et al. 2008, Pablos Alvarez 2009).

Los niveles elevados de IL-6 **perpetúan la sinovitis crónica** a través de distintos mecanismos, entre otros: activan células y mediadores proinflamatorios en la articulación, tales como neutrófilos, macrófagos y linfocitos T y B; regulan la diferenciación de las células B y, por tanto, la producción de anticuerpos, estimulando la diferenciación de los plasmablastos a células plasmáticas maduras contribuyendo también a su supervivencia; promueven la liberación de IL-21 por parte de los linfocitos TCD4⁺ y así la activación de células B mediada por células T; inducen un aumento en los niveles de PCR activando al sistema del Complemento que, en combinación con los ICs formados por los autoanticuerpos, se dirigen contra el tejido sano destruyéndolo. Además, en sinergia con otras citocinas proinflamatorias, incrementa la liberación de factor de crecimiento endotelial vascular (**VEGF**, *vascular endothelial growth factor*) y con ello la formación y mantenimiento del *pannus* mediante la estimulación de la angiogénesis. Otra consecuencia de la señalización de la IL-6 es el refuerzo de las interacciones entre las células de inmunidad innata y las células del estroma, estableciéndose una retroalimentación positiva demostrada *in vitro*. Finalmente, a través de su acción sobre los FLS y los OC estimula la liberación de MMPs y RANKL, con la correspondiente destrucción de cartílago y hueso

(Choy 2012, Bottini y Firestein 2013, Burmester et al. 2014, Caiello et al. 2014, Calabrese y Rose-John 2014, Tanaka et al. 2014, Ota et al. 2015, McInnes et al. 2016) (Fig. 8).

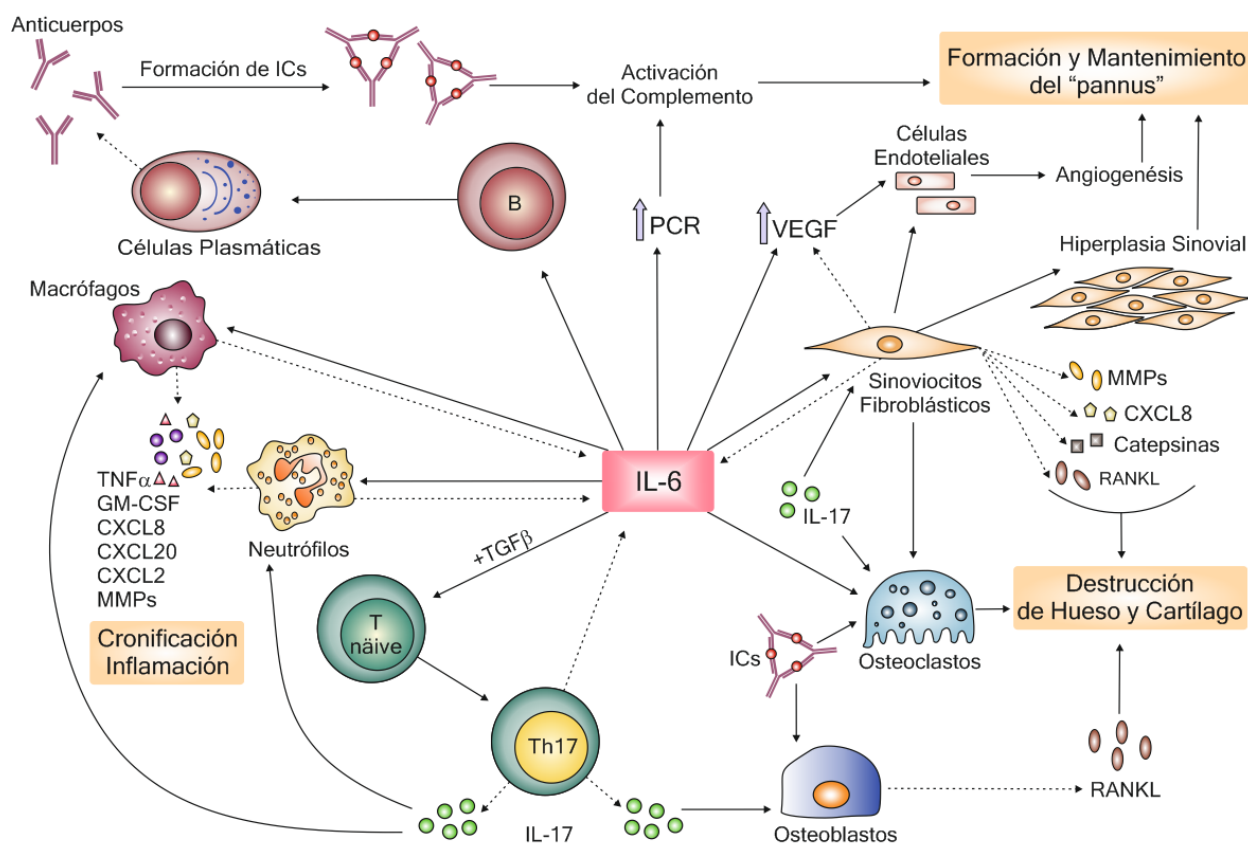


Figura 8. Papel de la Interleucina 6 en la AR: bucle de retroalimentación positiva y efectos a nivel articular.

2.4. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA AR

La AR es una enfermedad muy **heterogénea** en sus manifestaciones clínicas siendo además éstas muy poco específicas y compartidas con otras patologías, tanto reumáticas como no reumáticas.

2.4.1. CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN EN LA AR

Como consecuencia de su heterogeneidad, **no existen criterios diagnósticos** para la AR y, en la mayoría de casos, las primeras consultas del paciente no permiten realizar una diagnosis diferencial, siendo el diagnóstico de exclusión la **artritis indiferenciada (AI)** (Smolen et al. 2016a). Un porcentaje significativo de pacientes que presentan artritis indiferenciada progresará a AR, mientras que otros alcanzarán la remisión, por ello es de

enorme importancia su clara detección e identificación para aplicar terapias que permitan evitar la progresión de la enfermedad (Verpoort et al. 2004).

El abordaje del **diagnóstico** en la AR, se basa en una **historia clínica** precisa indagando sobre la historia **familiar** tanto de AR como de otras enfermedades autoinmunes, un **examen físico** completo enfocado a la detección de **sinovitis** y **test de laboratorio** que incluyan la determinación de los reactantes de fase aguda así como de **ACPA** y **FR**. Es igualmente importante, sobre todo en la artritis de inicio, hacer un diagnóstico diferencial de **exclusión de otras enfermedades** como las artritis infecciosas, el síndrome de Sjögren, espondiloartritis, polimialgia, etc. En los casos dudosos, las **pruebas de imagen** (ecografía y resonancia magnética) son de gran utilidad (SER 2014).

Los **criterios ACR** de 1987 del *American College of Rheumatology* (Arnett et al. 1988), que sustituían a los de 1956, si bien introdujeron notables mejoras en la clasificación de la AR, al desarrollarse a partir de una cohorte de AR de larga evolución no constituían una herramienta útil en la detección precoz de la AR. Así, en el año **2010** se presentaron los actuales criterios de clasificación **ACR/EULAR** del *American College of Rheumatology* y la *European League Against Rheumatism* en sustitución de los de 1987. El cambio fundamental consiste en **redefinir la artritis** centrándose en las características de la enfermedad en su **fase más temprana** y en identificar los factores que mejor discriminen a aquellos individuos que, recién evaluados con una sinovitis indiferenciada, presenten mayor riesgo de desarrollar una patología persistente/erosiva (Aletaha et al. 2010). Esta clasificación, si bien no siempre es equiparable al diagnóstico, sí permite al menos maximizar las poblaciones homogéneas de pacientes.

2.4.2. ÍNDICES DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD EN LA AR

La **actividad elevada de la enfermedad** de forma persistente en el tiempo es la causante última del daño irreversible y la pérdida funcional en la AR. Para poder **evaluar** el curso de la enfermedad y la eficacia de los tratamientos es necesario realizar medidas de la actividad de forma **periódica** (Welsing et al. 2001).

Dada la heterogeneidad de la artritis, la actividad de la enfermedad no puede ser medida en cada paciente individual de acuerdo con una única variable. Por ello se utilizan **índices compuestos**, que proporcionan una visión global de la enfermedad en un momento dado y evalúan la mejoría o el deterioro respecto a un punto temporal previo (en general el estado basal). Estos índices incluyen **signos y síntomas** (p. ej. recuento de articulaciones dolorosas y tumefactas); **medidas de laboratorio** (p. ej. reactantes de fase aguda como la **PCR** o la velocidad de sedimentación globular, **VSG**) y variables enfocadas a la evaluación del **dolor**

por parte del paciente. De forma complementaria se realizan cuestionarios, como el **HAQ** (*Health Assessment Questionnaire*) para que el paciente valore su grado de discapacidad y su calidad de vida (Smolen y Aletaha 2010, van Riel y Renskers 2016).

Los ejemplos más representativos de estos índices son los siguientes: el índice de actividad de la enfermedad (**DAS**, *Disease Activity Score*); el índice de actividad de la enfermedad basado en el recuento de 28 articulaciones (**DAS28**) y que puede a su vez ser calculado en función de los niveles de proteína C reactiva (**DAS28-CRP**) o de la tasa de sedimentación eritrocitaria (**DAS28-ESR**); los **criterios ACR** y, finalmente, nuevos índices como el simplificado de actividad de la enfermedad (**SDAI**, *Simplified Disease Activity Index*) y el índice clínico de actividad de la enfermedad (**CDAI**, *Clinical Disease Activity Index*) (van der Heijde et al. 1993, Prevoo et al. 1995, Smolen et al. 2003, Aletaha et al. 2005). En la [tabla 3](#) se muestran los componentes de cada uno de estos índices, así como los puntos de corte que definen sus categorías y que se emplean para evaluar la consecución de los objetivos terapéuticos (Smolen et al. 2016a). Recientemente se ha confeccionado y validado un nuevo índice de actividad para la artritis de reciente comienzo denominado **HUPI** (*Hospital Universitario de la Princesa Index*) (Castrejón et al. 2013).

Actualmente y de acuerdo con el enfoque hacia terapias personalizadas, el **objetivo** en el tratamiento de la AR es **reducir** al máximo posible la **actividad** de la enfermedad, siendo la **remisión** el objetivo final deseable. Por tanto, una **monitorización** intensiva a lo largo del seguimiento con estos índices de evaluación permite optimizar el tratamiento consiguiendo el mayor beneficio para el paciente (Dougados et al. 2007, Smolen y Aletaha 2015).

Tabla 3. Índices Compuestos de Actividad de la Enfermedad en la AR.

ÍNDICE	COMPONENTES	PUNTOS DE CORTE			
		Remisión	Actividad Baja	Actividad Moderada	Actividad Alta
DAS28-VSG	- Recuento de articulaciones dolorosas (en 28 articulaciones) - Recuento de articulaciones inflamadas (en 28 articulaciones) - Velocidad de sedimentación globular - Valoración del estado general	< 2.6	2.6 a 3.2	> 3.2 a ≤ 5.1	> 5.1
DAS28-PCR	- Recuento de articulaciones dolorosas (en 28 articulaciones) - Recuento de articulaciones inflamadas (en 28 articulaciones) - Proteína C reactiva - Valoración del estado general	< 2.6	2.6 a 3.2	> 3.2 a ≤ 5.1	> 5.1
SDAI	- Recuento de articulaciones dolorosas (en 28 articulaciones) - Recuento de articulaciones inflamadas (en 28 articulaciones) - Valoración global realizada por el paciente - Valoración global realizada por el médico - Proteína C reactiva	≤ 3.3	> 3.3 a 11	> 11 a ≤ 26	> 26
CDAI	- Recuento de articulaciones dolorosas (en 28 articulaciones) - Recuento de articulaciones inflamadas (en 28 articulaciones) - Valoración global realizada por el paciente - Valoración global realizada por el médico	≤ 2.8	> 2.8 a 10	> 10 a ≤ 22	> 22
ACR-EULAR (REMISIÓN)	- Índice SDAI - Índice CDAI - Criterios Booleanos: Recuento de articulaciones dolorosas e inflamadas (en 28 articulaciones); valoración global realizada por el paciente; Proteína C reactiva	SDAI ≤ 3.3 CDAI ≤ 2.8 Booleanos ≤ 1 (en todos)	--	--	--

(Adaptada de Smolen *et al.*, 2016)

2.5. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LA AR

La AR es una enfermedad crónica **incurable** ya que al ser aún su etiología un interrogante no es posible desarrollar tratamientos causales. El objetivo clásico del tratamiento de esta y otras enfermedades crónicas, como la Diabetes Mellitus, era prevenir el daño orgánico. Sin embargo, a mediados de la década de los 90 comenzó a tomar fuerza la idea de que el curso de la enfermedad podía modificarse y que la intervención temprana suponía una gran mejora en el desenlace de la misma. Las **terapias biológicas** y **no-biológicas**, como los **FAMEs**, o como se denominan en su acepción en inglés **DMARDs** (*disease-modifying antirheumatic drugs*), han mostrado buenos resultados. Sin embargo, su eficacia está condicionada al retraso en el inicio del tratamiento y al tiempo de exposición al mismo, comprobándose que cuanto mayor es el tiempo menor es la tasa de respuesta y que, en muchos pacientes, continúa la progresión del daño articular (Smolen y Aletaha 2015, Smolen et al. 2016b). Ante esta situación se produce un cambio de estrategia que se plasma en el enfoque conocido como **treat-to-target** (T2T o TTT) (Smolen et al. 2010, Smolen y Aletaha 2015, Smolen et al. 2016b). El T2T se define generalmente como una estrategia de tratamiento en la que el clínico trata al paciente de forma **suficientemente agresiva** como para **alcanzar y mantener metas** explícitamente especificadas y medidas secuencialmente, como son la **remisión** o la **baja actividad** de la enfermedad (Solomon et al. 2014). Además, la estrategia T2T engloba otro de los conceptos que actualmente guía las decisiones terapéuticas en la AR, el “**tratamiento personalizado**”², en el cual una evaluación regular de la actividad de la enfermedad supone adaptaciones y cambios en el tratamiento acordes a esa actividad (Keith et al. 2012, Smolen y Aletaha 2015).

En el manejo clínico de la AR existen distintos **enfoques terapéuticos** en función del **objetivo** a conseguir (tratamiento de los síntomas o modificación de la enfermedad) y de la **fase** en que se encuentre el paciente (AR temprana o AR establecida). En el caso del **tratamiento sintomático** de la AR se emplean **analgésicos** para reducir el dolor y antiinflamatorios no esteroideos (**AINEs**) para reducir dolor y rigidez. Históricamente los AINEs se encontraban en la primera línea de tratamiento, pero su limitada efectividad junto con su incapacidad de modificar el curso de la enfermedad a largo plazo y sus efectos secundarios los han relegado a un segundo plano (Scott et al. 2010). En cuanto a la modificación de la enfermedad, hace más de 70 años entraron en juego los

² En la práctica se considera que si en 3 meses se ha alcanzado el estado de baja actividad de la enfermedad (o mejoría en un 80% de los índices SDAI o CDAI) hay una alta probabilidad de lograr el objetivo terapéutico en 6 meses. Si no se ha producido esa mejoría en los 3 primeros meses es necesario adaptar el tratamiento. Si no se ha alcanzado la baja actividad de la enfermedad en 6 meses el tratamiento debe ser re-evaluado (Smolen, J. S., et al. (2015) *Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges*. Nat Rev Rheumatol 11(5): 276:289).

glucocorticoides que, a corto plazo consiguen reducir la sinovitis y son útiles en las recidivas de la enfermedad para lograr una mejoría rápida que dé tiempo al reajuste del resto de tratamiento. Además, a largo plazo reducen el daño articular y administrados de forma local intra-articular son muy efectivos (Bijlsma et al. 2002). Pero las piedras angulares del tratamiento de la artritis son los **fármacos modificadores de la enfermedad**, tanto los biológicos como los sintéticos. Dentro de los no biológicos o **sintéticos** encontramos el metotrexato (**MTX**), la sulfasalazina, la leflunomida y otros de uso más reducido como las sales de oro, la ciclosporina y las cloroquinonas. Ya sea en solitario o combinados, reducen el dolor, la hinchazón y los reactantes de fase aguda, limitan el daño articular progresivo y mejoran la funcionalidad. De hecho, se ha observado que la monoterapia con MTX en pacientes “naive” con AR de reciente comienzo alcanza tasas de respuesta ACR70³ en un 25% de estos. En cuanto a las terapias **biológicas** destacan los inhibidores de TNF, el Rituximab, el Abatacept y el Tocilizubam. La combinación de agentes biológicos que actúan sobre diferentes dianas normalmente no incrementa la eficacia del tratamiento pero si sus efectos tóxicos (Scott et al. 2010, Smolen y Aletaha 2015).

En cuanto a la fase de la enfermedad, de acuerdo con las **recomendaciones EULAR/ACR** (Smolen et al. 2014b), en el momento en que se produce el diagnóstico de la misma (**artritis de reciente comienzo**) se prescribe algún **FAME**, comúnmente MTX, combinándolo con otros y/o con bajas dosis de glucocorticoides, hasta alcanzar el **control de la enfermedad** y, solo en pacientes no respondedores o con respuesta incompleta se introduce alguna terapia biológica. En el momento en que se alcanza la remisión, el tratamiento se reduce a un único FAME, dado que el cese completo de la terapia suele conllevar mayor riesgo de recidivas (Smolen et al. 2010, Smolen et al. 2016b). Si se trata de **artritis establecida** el objetivo es **minimizar la actividad de la enfermedad**. Esto se puede conseguir con **FAMES** y **terapias biológicas**, en solitario o en combinación y con adición o no de glucocorticoides. El agente biológico de primera elección suele ser uno de los **inhibidores de TNF** (Infliximab, **IFX**; Adalimumab, **ADA**; Certolizumab pegol, **CZP**; Etanercept, **ETN**; o Golimumab, **GOL**) y, en caso de no lograrse respuesta, se plantea el cambio a otro de los inhibidores de TNF o a otros biológicos que lleven a cabo de depleción de linfocitos B (Rituximab), el bloqueo de la co-estimulación de las células T (Abatacept, **ABT**) o la

³ Los criterios de respuesta ACR (American College of Rheumatology) miden la efectividad de los tratamientos de la artritis reumatoide comparando la mejora en la actividad de la enfermedad entre dos momentos concretos de la misma. La respuesta ACR se clasifica como ARC20, 50 o 70, en función de que el porcentaje de mejoría en el número de articulaciones dolorosas e inflamadas, así como en al menos otros 3 criterios de evaluación (valoración del paciente, valoración del médico, escala de dolor, cuestionario sobre discapacidad funcional y reactantes de fase aguda) haya sido \geq del 20, 50 o 70% respectivamente.

inhibición de otras citocinas como la IL-6 (Tocilizumab, TCZ) o IL-1 (Anakinra) (Smolen et al. 2010, Smolen et al. 2012, Nam et al. 2014a) (Fig. 9).

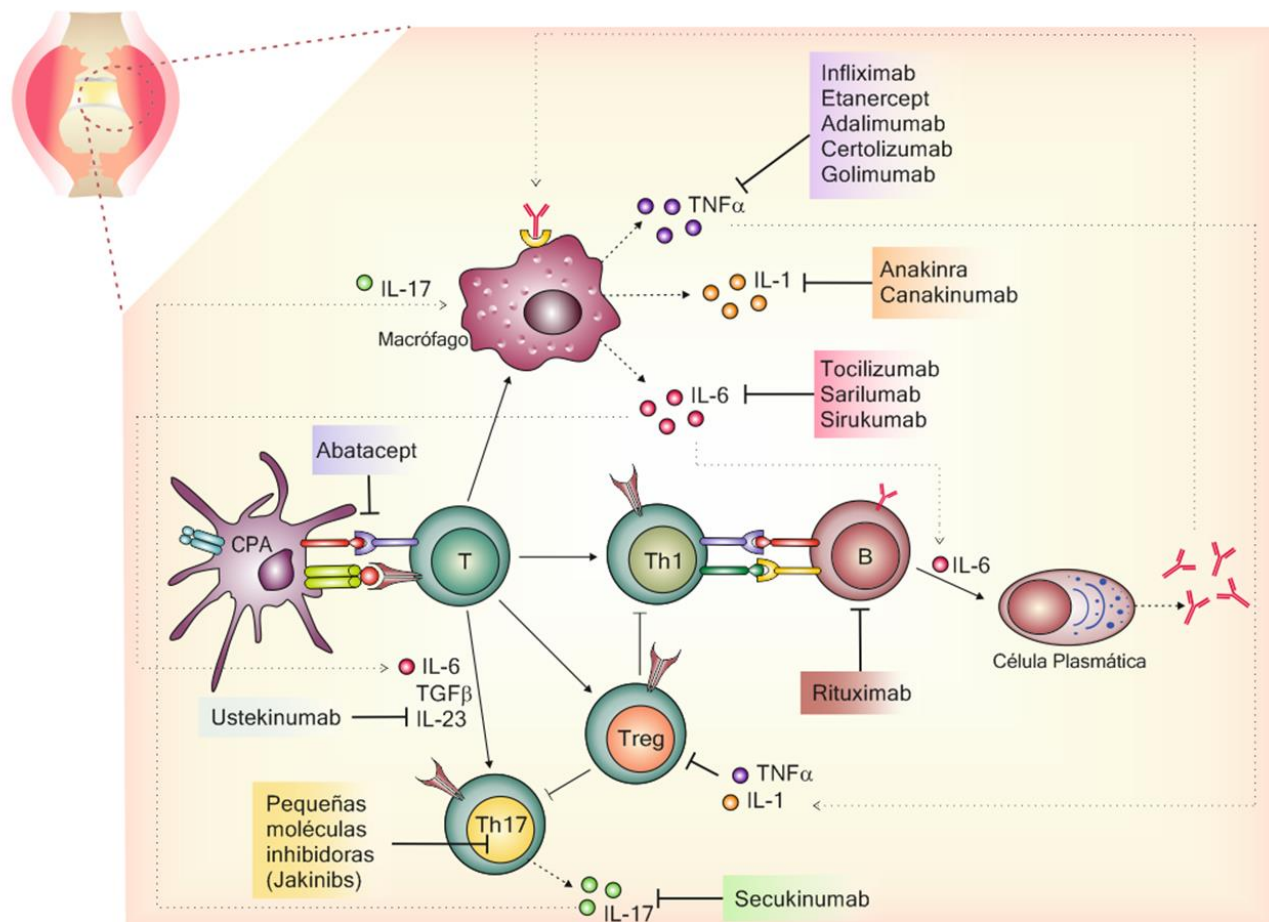


Figura 9. Agentes terapéuticos biológicos empleados en el tratamiento de la AR.

La definición de cuál debe considerarse un “buen” *outcome* en la AR es claro objeto de debate. Como hemos mencionado, el objetivo terapéutico ideal a lograr en el manejo de la AR es la **remisión**. Si bien su definición conceptual sigue siendo controvertida, en general se entiende como la ausencia total de síntomas clínicos y la detención de la progresión del daño estructural y la discapacidad (Shahouri et al. 2011). Una vez alcanzada una remisión sostenida, la recomendación es suprimir el tratamiento de forma vigilada para evitar las posibles recaídas. En el estudio BeSt se ha observado que hasta un 25% de los pacientes tratados con FAMEs eran capaces de mantenerse en remisión libre de fármacos (Klarenbeek et al. 2011). En muchos casos conseguir la remisión completa no es posible. Entonces se considera como objetivo aceptable alcanzar una **baja actividad de la enfermedad** (LDA, *low disease activity*), es decir, un estado en el cual la progresión del daño y de la discapacidad funcional son mínimas, permitiendo mantener una buena calidad de vida y capacidad de trabajo (Radner et al. 2014).

Existe una importante controversia en cuanto a los conceptos “efectividad” y “**coste-efectividad**” (rentabilidad) en el manejo clínico de AR, que debe ser eficaz pero también asequible. Por un lado, el **coste del tratamiento** varía de FAMES (más baratos) a biológicos (muy costosos); por otro lado el **coste médico** es muy diferente si el tratamiento tiene efecto a corto plazo o si se requieren tratamientos muy prolongados en el tiempo. Además se suma a la ecuación, el **coste social**, que es mayor cuanto más duradera y severa es la enfermedad (incapacidad física, dependencia, pérdida de mano de obra). La terapia biológica tiene el mayor potencial en cuanto a reducir los costes médico y social, sin embargo, y no sin controversia, no se consideran rentables como primera línea de tratamiento en la AR temprana dado el elevado coste del tratamiento (Finckh et al. 2009, Scott et al. 2010, Joensuu et al. 2015).

Una **clase nueva** dentro de los FAMES está emergiendo en la actualidad como tratamiento oral para enfermedades como la AR, la psoriasis y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Se trata de **moléculas pequeñas inhibitoras** de las vías de señalización de las **JAK** cinasas (**Jakinibs**). El Tofacitinib, dirigido contra JAK1 y 3, y el Baricitinib contra JAK 1 y 2, han demostrado una eficacia considerable, especialmente cuando se utilizan en etapas tempranas de la enfermedad. El Tofacitinib ya ha sido aprobado en EEUU y otros países, si bien su aprobación en Europa aún está pendiente, mientras que el Baricitinib se encuentra en fase III en ensayos clínicos (Choy et al. 2013, O’Shea et al. 2015, Smolen et al. 2016a). Además, nuevas vías de señalización intracelular están siendo objeto de estudio como posibles dianas terapéuticas. Tal es el caso de la vía del GM-CSF, la vía de la PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa), la de la tirosina cinasa de Bruton, así como terapias basadas en células dendríticas tolerogénicas (Cheung y McInnes 2017).

En cualquier caso, el desarrollo de estrategias terapéuticas personalizadas como base del manejo de esta enfermedad hace imprescindible **caracterizar** las particularidades **clínicas** y **moleculares** de cada paciente de forma **individual** con el fin de establecer categorías o **subgrupos** de pacientes que puedan beneficiarse de uno u otro tratamiento. En esta estratificación juegan un papel importante los **biomarcadores**, los cuales dada su relevancia en el presente trabajo serán abordados en mayor profundidad en apartados posteriores.

2.5.1. LA VENTANA DE OPORTUNIDAD EN LA AR

Han pasado ya muchos años desde que los clínicos abandonaron el enfoque piramidal del “*start low, go slow*” y confirmaron que una **terapia temprana** intervenía en el proceso de inflamación y de destrucción de hueso y cartílago, mejorando el resultado general a largo

plazo para los pacientes con AR. Por tanto, impidiendo la carga inflamatoria inicial existe una posibilidad de **cambiar el curso natural** de la enfermedad (McCarty 1990, Nell et al. 2004).

Bajo esa premisa, se entiende por **ventana de oportunidad** (*window of opportunity*) en la AR el periodo inicial de la enfermedad, en el cual se puede evitar la aparición del daño articular a través de una terapia precoz y continuada que reduzca la carga inflamatoria interfiriendo en las fases tempranas del proceso destructivo (Smolen y Aletaha 2015).

La existencia de este periodo es una suposición razonable dado que los cambios estructurales en la artritis, que además son irreversibles en la mayoría de casos, suelen tardar un tiempo en desarrollarse. Además, se ha comprobado que la **asociación** entre la **duración de los síntomas** y la **persistencia** de la AR **no es lineal**, sugiriendo la presencia de un cierto periodo temporal durante el cual la enfermedad es más susceptible al tratamiento (van Nies et al. 2015). De hecho, la prolongación de la duración de los síntomas se asocia con mayor progresión radiológica y una menor probabilidad de remisión sostenida sin terapia con FAMES (van Nies et al. 2014). En este sentido, es importante seguir estrechamente los principios de T2T lo antes posible (en las primeras 12-16 semanas después de la aparición de los síntomas o el diagnóstico) dado que los estudios muestran un efecto impresionante de esta estrategia sobre la progresión radiológica y el pronóstico general, especialmente en los pacientes con artritis temprana (Nell et al. 2004, Nam et al. 2014b). Todos estos datos apoyan la existencia de la ventana de oportunidad.

Es complicado establecer el **tiempo de duración** de dicha ventana, sobre todo dada la heterogeneidad e imprecisión en cuanto a la definición del inicio de la enfermedad. En general se asume que va aproximadamente **desde 3 meses hasta 2 años** desde el momento de **inicio de los síntomas**, siendo efectivamente esos 3 primeros meses el punto clave de actuación (Raza 2010, Raza et al. 2012) (Fig. 10).

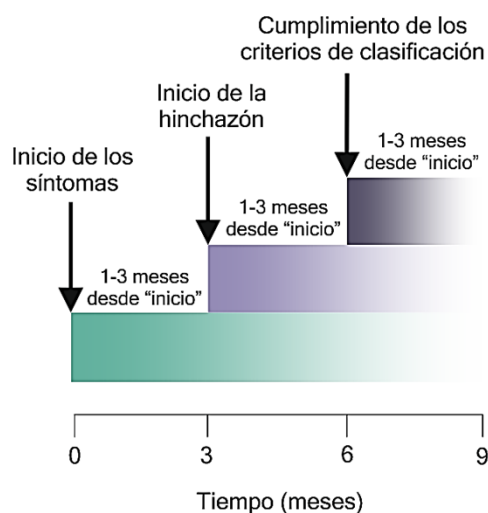


Figura 10. Representación esquemática de los distintos posibles inicios de la ventana de oportunidad en la AR. (Adaptada de Raza et al., 2012)

Por otro lado, se puede considerar otra ventana de oportunidad la que facilitan los diferentes **perfiles de citocinas** y quimiocinas observados en las primeras semanas de la

enfermedad (hasta 3 meses después del inicio de los síntomas). El perfil caracterizado por la presencia, entre otras, de IL-2, 4, 13, 17, 15 y factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) forma parte del microambiente requerido para convertir la sinovitis temprana en persistente, de modo que no se observa en formas de AR establecida (Raza et al. 2005). Por tanto, un tratamiento intensivo en este punto podría prevenir la cronificación e invertir el curso de la enfermedad.

Por último, una hipotética tercera ventana de oportunidad emerge actualmente en la base del concepto de AR preclínica o **pre-AR** y los factores que convierten a un individuo en **susceptible** de padecer la enfermedad (Mankia y Emery 2016b). Este concepto lo abordamos con un poco más de detalle en el siguiente apartado.

Todos estos hallazgos han conducido a la creciente implementación de clínicas de artritis temprana, diseñadas para facilitar una cooperación más estrecha entre los médicos de atención primaria y los servicios de reumatología con el fin de favorecer el diagnóstico preciso y el tratamiento precoz tan deseable.

2.5.2. LA ARTRITIS PRE-CLÍNICA: EVALUACIÓN DEL RIESGO

Como hemos analizado anteriormente, el inicio del tratamiento en las etapas más tempranas de la enfermedad se traduce en mejores resultados, menor daño articular y mayor probabilidad de alcanzar la remisión. Esta idea hace necesario responder a la pregunta, ¿qué es realmente la enfermedad temprana?

Hasta hace relativamente poco tiempo, se entendía por “**enfermedad temprana**” la fase inicial de la AR después de la detección clínica de la misma. Sin embargo, estudios recientes sugieren que en realidad el proceso que lleva a la enfermedad se inicia en el **periodo preclínico o pre-AR**. Por tanto, la manifestación de la artritis en realidad es la cúspide de un conjunto de eventos patológicos que se iniciaron mucho antes (Mankia y Emery 2016a). De acuerdo con EULAR, y en función de la comprensión actual de la AR, se pueden establecer **6 fases** en su desarrollo (Gerlag et al. 2012), si bien no todos los individuos llegan a pasar por todas las fases. Además, muchos individuos sanos, a pesar de la presencia de factores de riesgo, nunca llegarán a desarrollar la patología; que ésta llegue a desarrollarse depende de la existencia de ciertos eventos que hagan que se cruce el límite entre el riesgo y la enfermedad y que, actualmente, se han visto asociados a eventos autoinmunes localizados en mucosas (Mankia y Emery 2016a).

La primera evidencia de que el proceso inmunológico en la AR antecede a la inflamación articular se obtuvo a principios de los años 90, al observar que la presencia de autoanticuerpos como el FR precedía en muchos años a los signos clínicos de la enfermedad

(Aho et al. 1991). Además, en este contexto y en relación a la asociación a mucosas, se ha detectado que un autoanticuerpo frecuente en el suero de pacientes con AR en la fase preclínica son los ACPA con isotipo IgA (clase predominante de anticuerpo en las secreciones de las mucosas) (Bos et al. 2014).

Junto con los **factores de riesgo genéticos, ambientales** y la **seropositividad**, en la fase preclínica hay otras características que pueden permitir a los reumatólogos detectar a pacientes en riesgo de AR. Por un lado, se produce un **aumento** anormal en los niveles de **citocinas** y **quimiocinas**, así como alteraciones metabólicas y del microbioma (Holers 2014). Por otra parte, existe un amplio **conjunto de síntomas** que son descritos por los pacientes antes del inicio de la enfermedad, tales como dolor, rigidez, fatiga y debilidad muscular. Así mismo, el calentamiento y enrojecimiento de la piel en personas con artralgiás son también manifestaciones que preceden a la inflamación articular (Stack et al. 2014). Además, las técnicas de exploración con ultrasonidos y resonancia magnética para detectar **cambios articulares sutiles** previos al establecimiento de la enfermedad están también adquiriendo importancia (de Hair et al. 2014, Mankia y Emery 2016a).

Todo este cúmulo de indicios y biomarcadores son el punto de partida clave para la **predicción del riesgo** de desarrollo de la AR, así como la **estratificación** del mismo, permitiendo establecer categorías de individuos en los cuales la ratio riesgo/beneficio favorezca una **intervención terapéutica preventiva** impidiendo la tendencia natural hacia la fase clínica de la enfermedad.

2.5.3. LIMITACIONES A LA MEDICINA PERSONALIZADA

La remisión en la AR se ha convertido en una meta realista, sobre todo cuando la enfermedad se ataja en las etapas más precoces y tanto los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 como las recomendaciones EULAR para el manejo de la AR se centran en la enfermedad temprana. Sin embargo, datos de estudios recientes revisados por Zeidler muestran que existe un **riesgo** significativo de **clasificación errónea** y destacan que el **sobrediagnóstico** puede convertirse en un problema importante, sobre todo cuando se prescriben FAMEs, tanto sintéticos como biológicos (Zeidler 2012). Por tanto, todavía es necesario un mayor consenso en la definición de la AR temprana y su diferenciación de otras artritis tempranas.

A pesar de los claros beneficios de la estrategia del **T2T**, existen diversas **barreras a su implantación** que han sido revisadas por Solomon y cols. (Solomon et al. 2014). Hay un notable número de **pacientes con AR que no reciben tratamiento con FAMEs**, ya sea por falta de disponibilidad, por su elevado coste o por la existencia de contraindicaciones en su

prescripción. Además, no es infrecuente que sean los propios **pacientes** los que **se nieguen** a cambiar de tratamiento para adaptarse a la estrategia del T2T; un 77% de pacientes manifiestan estar satisfechos con su tratamiento a pesar de que un 71% continúan sufriendo una actividad de la enfermedad moderada o alta. Para el paciente, la percepción de una mejoría respecto a su estado inicial suele ser suficiente, independientemente de que se haya alcanzado o no el objetivo terapéutico. Por otra parte, muchos **pacientes no tienen acceso a un reumatólogo** y los médicos no-reumatólogos suelen ser reacios a prescribir FAMEs. Finalmente, desde el punto de vista del clínico, seguir el enfoque del T2T es complejo puesto que requiere un **seguimiento mucho más exhaustivo**, con visitas frecuentes y el uso de medidas de actividad de la enfermedad estructuradas y unificadas, así como el acceso inmediato a los FAMEs para una rápida escalada del tratamiento ante la enfermedad activa en curso.

Por otra parte, incluso aunque los médicos dispongan de los FAMEs, todavía son **escasos o nulos los indicios** que les indican cuál debe ser el fármaco elegido; de ahí la necesidad de encontrar **biomarcadores** que faciliten la decisión sobre el tratamiento más apropiado. La cuestión fundamental es si todos los pacientes tienen la misma oportunidad de respuesta con todas las terapias o bien si hay diferentes grupos de **pacientes diferencialmente respondedores** a unas frente a otras. Sin embargo, distintos hechos, revisados por Smolen y Aletaha (Smolen y Aletaha 2013), ponen en duda que los biomarcadores de respuesta al tratamiento disponibles actualmente en la práctica clínica puedan resolver este dilema. En primer lugar, si es cierta la existencia de distintos grupos de respondedores, cabe suponer que la probabilidad de éxito de una terapia varíe en función de los grupos y que aquellos que fracasen ante una terapia dirigida deberían responder mejor ante un tratamiento que tenga como diana otra diferente a la primera. Sin embargo, en el caso de la terapia dirigida contra TNF, no existen evidencias de que la proporción de pacientes que fracasan al bloqueo de TNF y después responden a terapias dirigidas hacia otra diana, sea mayor que la de pacientes que, tras el fracaso del bloqueo sí respondan a otra forma de inhibición de TNF (Schoels et al. 2012). Asimismo, si existiera una separación tan marcada de los pacientes en función de su capacidad de respuesta a una terapia de bloqueo de TNF, la eficacia de un tratamiento nuevo distinto debería no reducirse en función del número creciente de terapias anteriores con anti-TNF y, en la práctica clínica, así parece ser (Chatzidionysiou et al. 2011).

Todos estos hechos en su conjunto no deben desalentar la búsqueda de biomarcadores ni poner en duda su capacidad para discriminar grupos de pacientes que puedan beneficiarse en mayor medida de determinadas terapias, únicamente ponen de manifiesto que en el

momento actual los marcadores disponibles no parecen suficientes para cubrir esas expectativas. Por ello, la investigación en esta área supone un gran reto para la reumatología.

3. ESPONDILOARTRITIS

3.1. ORÍGENES, EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA EspA

El concepto de espondiloartritis fue precedido por el término “espondilitis anquilosante”. Esta expresión, derivada de las palabras Griegas *ankylosis* (doblado o torcido) y *spondylos* (vértebra), dio nombre a unos peculiares rasgos descritos por P. Raymond en 1912 en ilustraciones de momias y tumbas del Antiguo Egipto. No sería hasta la década de los 60 cuando un grupo de reumatólogos reunidos en un congreso en Roma clasificaron clínicamente la **espondilitis anquilosante (EA)** como una entidad diferente a la AR. Unos años más tarde, en 1974, Moll y Wright acuñarían el término **espondiloartrides seronegativas**, como un conjunto de enfermedades que incluían a la EA y caracterizadas por la ausencia del FR. Tiempo después se corroboró la fuerte asociación de esas patologías con la presencia del antígeno de histocompatibilidad **HLA-B27** (*human leukocyte antigen B27*), dando lugar al concepto unificado de **espondiloartritis (EspA)** tal como lo consideramos hoy día. Este grupo de enfermedades comprende, además de la EA, la artritis psoriásica, la artritis reactiva, la artritis asociada a enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis juvenil idiopática. Todas ellas son patologías semejantes con características clínicas diferentes, relacionadas entre sí y con una base genética común (Moll et al. 1974, Wright 1978, Moll 1983, Dougados y Baeten 2011, Garg et al. 2014, SER 2014).

La **prevalencia** estimada de las EspA está entre **0,4 y 1,9%** respondiendo este amplio rango, sobre todo, a las diferencias étnicas. En Europa, concretamente, se sitúa en un 1,2%. Se trata de enfermedades que afectan más comúnmente a **hombres** y que se inician típicamente a edades jóvenes (**<45 años**). A pesar de esa pronta manifestación, dada la ausencia de rasgos patognomónicos, el diagnóstico temprano es complicado y puede llegar a retrasarse entre 8 y 11 años desde el inicio de la patología (Feldtkeller et al. 2003). Este hecho supone demoras en el tratamiento y una tremenda **carga sintomática** que conduce a una **incapacidad funcional** severa durante los años más productivos de la vida laboral (Montacer Kchir et al. 2009). Por tanto, el coste de estas enfermedades es elevado a nivel de efectividad, capacidad de trabajo y absentismo laboral (Boonen 2006).

Las EspA presentan un **espectro clínico** tan variado como el propio conjunto de enfermedades. Encontramos abundantes **manifestaciones osteomusculares**: dolor lumbar inflamatorio (**DLI**), síntoma más común, de comienzo insidioso, con marcada rigidez matutina y que mejora con la actividad física; artritis periférica asimétrica y de grandes articulaciones, sobre todo en extremidades inferiores; la dactilitis, sacroileitis, espondilitis y el rasgo clave de las EspA, la **entesitis**⁴. Por otro lado, enfermedades **oculares** como la conjuntivitis y la uveítis⁴, lesiones de la **mucosa intestinal**, **psoriasis**, la elevación de la **PCR** y la buena respuesta a AINES son otras manifestaciones igualmente características (SER 2014, van Tubergen 2015).

3.2. PATOGÉNESIS DE LA EspA: GENÉTICA Y SISTEMA INMUNE

3.2.1. EL COMPONENTE GENÉTICO DE LA EspA

Del mismo modo que veíamos en el caso de la AR, las EspA tienen también un **componente genético de riesgo** muy notable, cuya caracterización se ha llevado a cabo fundamentalmente en la EA. Estudios de agregación familiar y estudios con gemelos confirman que los factores de riesgo genéticos suponen hasta un **90%** de la **susceptibilidad** a EA. Dentro de ese factor de riesgo genético, el papel protagonista lo ocupa el gen de **HLA-B27**, una molécula de **HLA de clase I**. La asociación se hace patente por el hecho de que el **94% de los pacientes** con EA son **HLA-B27+** y porque ratas transgénicas para ese locus desarrollan una enfermedad espontánea similar a las espondiloartritis (Hammer et al. 1990, Dougados y Baeten 2011). En la población caucásica la prevalencia del HLA-B27 es solamente de un 5-6% y, a su vez, solo una pequeña proporción de los portadores (1-5%) llegan a desarrollar la EA, de manera que la positividad para HLA-B27 explica únicamente un tercio de la susceptibilidad genética (Australo-Anglo-American Spondyloarthritis et al. 2010, Bowness 2015). Esto indica necesariamente la existencia de **genes adicionales** implicados en la patogénesis de estas enfermedades.

Estudios de GWAS han identificado diversos *loci* con asociación definida a la EA, tales como, el gen de la aminopeptidasa del retículo endoplásmico, **ERAP1** (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*) y el gen del receptor de la IL-23 (**IL-23R**). Además, parecen existir asociaciones potenciales con el gen del receptor 1 de TNF (**TNFRSF1A**, *TNF receptor superfamily member 1A*), el gen de la molécula de señalización de dominio de muerte asociada al receptor del factor de necrosis tumoral 1 (**TRADD**, *TNF receptor type 1-*

⁴ **Dactilitis** o “dedo en salchicha”: inflamación de un dedo de la mano o del pie. **Sacroileitis**: inflamación de una o ambas articulaciones sacroilíacas, los lugares donde la columna lumbar y la pelvis se conectan. **Espondilitis**: inflamación de una o varias vértebras. **Entesitis**: inflamación de las entesis, zonas de unión de ligamentos, tendones y cápsula articular al hueso. **Uveítis**: inflamación e irritación de la úvea, capa media del ojo.

associated DEATH domain protein), genes de citocinas proinflamatorias como la superfamilia 15 de TNF (**TNFSF15**) o la **IL-1A** y el receptor 2 de la IL-1 (**IL-1R2**) (Tabla 4).

Tabla 4. Principales loci asociados a la Espondilitis Anquilosante.

GEN	LOCUS	FUNCIÓN PUTATIVA
HLA-B	6p21.3	Presentación de antígenos a las células T; plegamiento incorrecto que desencadena estrés en el RE; formación de homodímeros que activan células NK
ERAP1	5q15	Aminopeptidasa encargada del procesamiento de péptidos previo a la presentación por HLA-I
IL23R	1p31	Receptor de citocinas que media en la activación y diferenciación celular
IL6R	1q21	Receptor de citocinas que media en la diferenciación de células Th17, entre otros efectos inmunológicos
ILR2-R1	2q11	Receptores que median la respuestas a la IL-1
ANTXR2	4q21	Receptor de la toxina del ántrax. Interviene en la morfogénesis vascular y procesos de adhesión de la matriz extracelular
PTGER4	5p13	Receptor de la prostaglandina E. Induce la expresión de IL-23 y la activación/diferenciación de las células que expresan el receptor IL-23R; anabolismo del hueso
ERAP2	5q15	Aminopeptidasa encargada del procesamiento de péptidos previo a la presentación por HLA-I
IL12B	5q33	Citocina que media en la activación/diferenciación de células que expresan el receptor IL-23R
CARD9	9q34	Proteína con dominio de reclutamiento de caspasa. Defensa inmune innata; activación de células Th17 previa exposición a β -glucano
TNFRSF1A	12p13	Receptor que media la señalización del TNF
IL27	16p11	Citocina que regula el balance Th17/Th1
TYK2	19p13	Tirosina cinasa de la familia de las JAK que media en la señalización de los receptores de citocinas, incluyendo a IL-23R

(Adaptada de Brown *et al.*, 2016)

Finalmente, se encuentran bajo estudio otras asociaciones genéticas: el gen del transductor de señal y activador de la transcripción 3, **STAT3** (*signal transducer and activator of transcription 3*), el gen **MEFV** de la Fiebre Mediterránea Familiar (*familial mediterranean fever*) y genes del complejo principal de histocompatibilidad distintos de HLA-B27, tales como los genes **MICA** (*MHC class I polypeptide-related sequence A*) o genes que codifican receptores de las células **NK** (Wellcome Trust Case Control *et al.* 2007, Zinovieva *et al.* 2009, Australo-Anglo-American Spondyloarthritis *et al.* 2010, Pointon *et al.* 2010, Davidson *et al.* 2011, Breban *et al.* 2015, Brown *et al.* 2016). Dada su relevancia en la patogénesis de la EspA estudiaremos en mayor detalle algunas de las moléculas codificadas por esos genes de riesgo.

3.2.1.1. EL PAPEL DE HLA-B27 EN LA EspA Y SU RELACIÓN CON ERAP1

Tal como la hemos definido, **HLA-B27** es una molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase I. Las moléculas HLA-I se localizan en el cromosoma 6 y su función principal es la presentación de antígenos endógenos a los linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos (**LTC**) como parte de la respuesta **inmune adaptativa**. Además, estas moléculas también desempeñan un papel relevante en la regulación de la respuesta **inmune innata** a través del reconocimiento de los receptores **KIR** (*killer immunoglobulin-like receptors*) de las células **NK**. En condiciones fisiológicas HLA-B27 forma heterotrímeros constituidos por una cadena pesada α dividida en 3 dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) anclada a la membrana, una molécula de microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2m$) y el péptido endógeno. Este complejo se sitúa en la superficie celular, donde será reconocido por el TCR de los LTC (Bowness 2015).

A pesar de la robusta asociación entre la presencia del HLA-B27 y la EspA, el papel patogénico concreto de esta molécula sigue siendo desconocido. El marco fisiopatológico tradicional es la **hipótesis del péptido artritogénico** (Fig. 11), propuesta por Benjamin y Parham en 1990. De acuerdo con esta, la EspA podría estar causada por la unión de HLA-B27 a péptidos propios que se asemejan a péptidos derivados de patógenos o bien a péptidos derivados de microorganismos que se asemejan a péptidos propios (**mimetismo molecular**), que serían presentados a LTC originándose una respuesta inmune autorreactiva cruzada (Benjamin y Parham 1990). Esta hipótesis se sustenta en diversas evidencias tales como los casos de EspA desencadenados por infecciones gastrointestinales y urogenitales, sumado a la presencia de clones de LTC con respuestas inmunes restringidas a HLA-B27 contra antígenos bacterianos, así como contra proteínas propias del cartílago en articulaciones inflamadas (Hermann et al. 1993, Atagunduz et al. 2005). Si bien, el autoantígeno en la EspA aún no ha sido claramente identificado. Por otro lado, esta hipótesis se apoya también en el hecho de que diferentes subtipos de HLA-B27 muestran una asociación diferencial con la enfermedad. El B*2706, al que se atribuye un papel protector o no-asociado con la EspA difiere tan solo en dos residuos de aminoácidos del subtipo B*2704, fuertemente asociado a la enfermedad. De tal modo que cambios sutiles que afecten a la hendidura de unión al péptido pueden ser suficientes para alterar todo el repertorio (Bowness 2015). Sin embargo, no todas las evidencias van a favor de esta hipótesis. Además de la dificultad para demostrar las respuestas de LTC restringidas a HLA-B27 en las articulaciones de pacientes con EspA, los modelos animales de espondiloartritis en ratas transgénicas para HLA-B27 indican que las células LTC no son necesarias para el desarrollo de la enfermedad (May et al. 2003, Taurog et al. 2009).

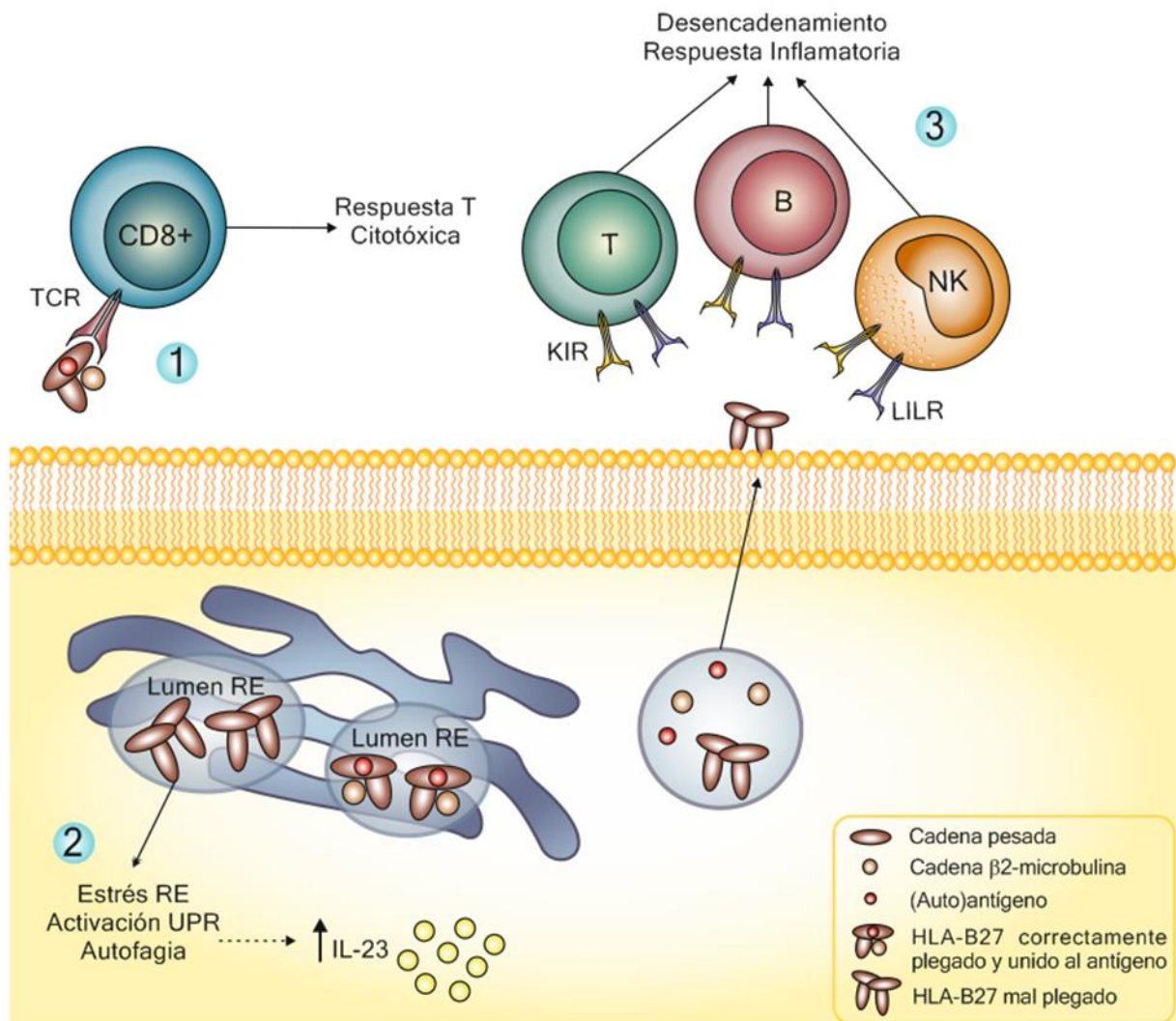


Figura 11. Implicación de HLA-B27 en la patogénesis de la EspA: (1) Hipótesis del Péptido Artrítico. (2) Hipótesis del mal plegamiento. (3) Hipótesis de la expresión de cadenas pesadas en la superficie celular.

Existen **dos hipótesis adicionales** propuestas para explicar el papel de HLA-B27 en la EspA (Fig. 11). Ambas argumentan a favor de un origen patogénico de tipo autoinflamatorio más que autoinmune, apelando al papel de HLA-B27 en el arranque de respuestas innatas más que en su papel canónico de presentación antigénica (Dougados y Baeten 2011). La primera de ellas es la del **plegamiento anómalo**. Esta hipótesis sugiere que en el retículo endoplásmico (RE) de las CPA se acumularían moléculas HLA-B27 con la cadena pesada mal plegada desencadenando respuestas frente a estrés por parte del RE, tales como la autofagia y la activación del mecanismo de señalización **UPR** (*unfolded protein response*) para reestablecer la homeostasis del sistema (Mear et al. 1999, Turner et al. 2005, Colbert et al. 2009). La UPR activaría a su vez a NF-κB y con ello el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1, IL-6) y de IL-23, por parte de macrófagos y CD,

provocando a su vez la activación de células productoras de IL-17, promoviendo la osteoclastogénesis, etc. (Layh-Schmitt y Colbert 2008, DeLay et al. 2009, Layh-Schmitt et al. 2013). La relevancia de esta hipótesis en humanos está en discusión dado que se trata de observaciones realizadas fundamentalmente en modelos animales.

La última de las hipótesis es la de la **formación de homodímeros**. Las cadenas pesadas de HLA-B27, libres de la $\beta 2m$, tienen la capacidad de formar homodímeros ($B27_2$) mediante puentes disulfuro a través del residuo Cys67 (Allen et al. 1999). Tanto los $B27_2$ como las propias cadenas pesadas libres, ante un estímulo estresante, se expresan en la superficie de las CPA y se unen a receptores de la inmunidad innata de células linfoides y NK, tipo **KIRs**, como el **KIR3DL2** y tipo **LILRs** (*leucocyte immunoglobulin-like receptors*) como el **LILRB2**, desencadenando respuestas proinflamatorias aberrantes (Bowness 2015).

El segundo candidato dentro de los genes de susceptibilidad a la EspA es **ERAP1**, responsable aproximadamente de un **15%** del riesgo genético en estas enfermedades. El gen de ERAP1 codifica una enzima aminopeptidasa del RE cuya función es el **recorte de péptidos** por el extremo N-terminal hasta alcanzar el tamaño óptimo para la presentación por parte de las moléculas de HLA-I (Kanaseki et al. 2006). Se ha comprobado que la asociación de ERAP1 con la EA únicamente existe en los individuos **HLA-B27+**, proporcionando evidencias de que HLA-B27 opera en la EA a través de un mecanismo que implica el procesamiento aberrante de péptidos antigénicos (Evans et al. 2011). Así, las variantes genéticas presentes en ERAP1 pueden contribuir a la patogénesis de la EspA alterando el **repertorio de péptidos** que se unen a HLA-B27 y con ello originando respuestas defectivas de los LTC y/o de las células NK (Seregin et al. 2013) o bien afectando al correcto **plegamiento de HLA** y a la exportación de homodímeros, cadenas pesadas libres y formas proinflamatorias de B27 a la superficie celular (Haroon et al. 2012). Sea directa o indirecta la interacción entre HLA-B27 y ERAP1, la inhibición de la aminopeptidasa del RE se plantea como una posible e interesante diana terapéutica (Chen et al. 2014).

3.2.2. EL SISTEMA INMUNE EN LA EspA

3.2.2.1. AUTOINMUNIDAD VS. AUTOINFLAMACIÓN

En términos generales se entiende que una enfermedad inflamatoria tiene **origen autoinmune** cuando está causada por elementos o respuestas aberrantes de la inmunidad adaptativa, mientras que se considera de **origen autoinflamatorio** cuando la alteración tiene su origen en el sistema inmune innato. En el caso de la EspA ambas ramas del sistema inmune parecen estar involucradas en su patogénesis (Stoll 2011).

Sin embargo, la ausencia de factores de riesgo genéticos compartidos entre la EspA y las enfermedades inflamatorias autoinmunes (como, por ejemplo, los polimorfismos en el gen de PTPN22), la ausencia de autoanticuerpos específicos de la enfermedad, la predominancia masculina sobre la femenina, la falta de respuesta ante terapias dirigidas contra las células T y B, la prevalencia de alteraciones mieloides en lugar de linfoides, etc. sugieren que el origen de la inflamación en la **EspA** es predominantemente de tipo **autoinflamatorio** (Ambarus et al. 2012). Además de la falta de características de la autoinmunidad clásica y

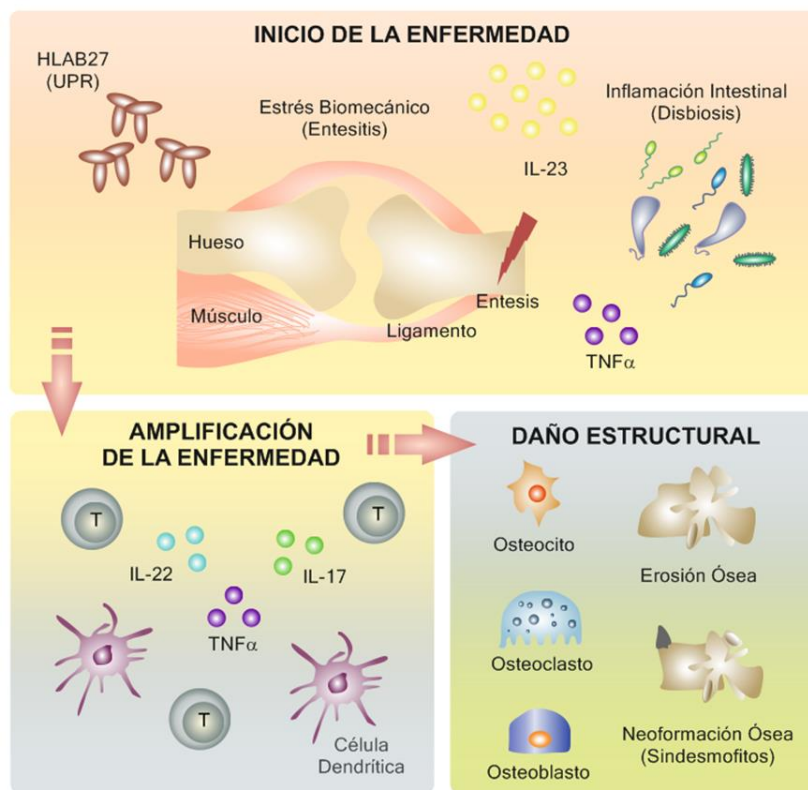


Figura 12. Comprensión actual de la secuencia de eventos que conducen al desarrollo y establecimiento de la EspA.

del fondo genético de la enfermedad (con la asociación a TNF, IL-1, IL-6, KIRs, etc.), otros dos hechos sustanciales apuntan hacia la disrupción de la respuesta innata. Por un lado la creciente importancia del papel de la **microbiota** y su **disbiosis** en la EspA (Girschick et al. 2008) y por otro la relevancia del **estrés mecánico** (microtraumas) y la **entesitis** (Benjamin y McGonagle 2009) (Fig. 12).

La **disbiosis** de la microbiota intestinal es una de las principales causas de las enfermedades inflamatorias intestinales. Entre las EII se encuentran la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, y ha sido ampliamente probado el **solapamiento** que existe entre estas patologías y las **EspA** (Asquith et al. 2014) apuntando hacia un posible mecanismo común en el origen de ambas enfermedades. Un estudio muy reciente sugiere una conexión para estas dos patologías basada en que la EspA está caracterizada por una disbiosis fecal distintiva con un gran incremento de *Ruminococcus gnavus*, siendo esta bacteria conocida por su papel proinflamatorio y su asociación a las EII (Brebant et al. 2017). Otros trabajos apuntan a que la inflamación intestinal está asociada con la actividad de la enfermedad a nivel de la articulación de modo que la disbiosis de la microbiota del intestino podría inducir la producción de IL-23 activando localmente la vía IL-23/Th17 (que estudiaremos en más

detalle a continuación) de tal manera que las células linfoides que expresan el IL-23R migrarían al torrente sanguíneo, médula ósea y articulaciones (Wendling 2016). Por otra parte, parece probable que HLA-B27 interaccione con la microbiota intestinal, ya sea actuando como receptor para la diseminación bacteriana; albergando en la hendidura de unión al péptido algún metabolito de microorganismos intestinales que altere su repertorio originando respuestas neo-inmunes; o bien, que a través de respuestas inmunes en el intestino origine una remodelación del microbioma y esa alteración conduzca a la EspA (Lin et al. 2014, Bowness 2015). En ese solapamiento entre EII y EspA, se observa que aproximadamente la mitad de pacientes con EspA presentan signos de inflamación intestinal y que la remisión de la enfermedad a nivel articular se asocia con una reducción en la inflamación del intestino y viceversa (Asquith et al. 2014). Las causas que conducen a la disbiosis incluyen la propia genética del huésped, factores ambientales como la dieta, el uso de anti/pre/pro-bióticos y alteraciones en la respuesta inmune frente a la microbiota “normal”. Esta disbiosis puede ser tanto causa como consecuencia de procesos inflamatorios y se acompaña, en cualquier caso, de una interrupción de la función homeostática y la permeabilidad de la barrera intestinal (Gill et al. 2015).

En lo relativo al **estrés biomecánico**, nuevos estudios clínicos y en modelos animales apuestan por un papel importante del **daño local** tanto en el **origen** como en la **progresión** de la EspA. En este contexto, las células inmunes residentes en las **entesis** constituirían el nexo entre ese daño local y la inflamación que induce la pérdida de hueso. De este modo se genera, en último término, la remodelación del tejido, la formación de sindesmotos y la anquilosis (Van Mechelen y Lories 2016).

La importancia de los factores biomecánicos en esta patología se sustenta, en primer lugar, en que es una enfermedad que afecta fundamentalmente al **esqueleto axial**, encargado de proporcionar estructura corporal, permitir el movimiento y que soporta una gran carga y estrés mecánico (Van Mechelen y Lories 2016). En segundo lugar, los síntomas que padecen los pacientes con EspA no están causados únicamente por la inflamación de las entesis, la sinovia y el hueso, sino también por **daño en la musculatura** y por **daño estructural**, responsables de la postura anormal, el dolor y la pérdida de movilidad y capacidad funcional (Machado et al. 2010). Finalmente, la hipótesis de que el origen de la EspA se encuentra en la **entesis** da soporte adicional a esta visión. Observaciones clínicas sugieren que el estrés mecánico desata la entesopatía y ésta la EspA; la prueba de concepto llevada a cabo por Jacques y cols. en el modelo de ratón $TNF^{\Delta ARE}$ así lo demuestra. En los ratones $TNF^{\Delta ARE}$ está suprimido un elemento regulador del gen de TNF que hace que su mensajero sea mucho más estable, conduciendo a una sobreexpresión de esta citocina. Los ratones desarrollan de

forma espontánea colitis, artritis y espondilitis, comprobándose que los primeros signos de inflamación se producen, efectivamente, en las entesis. Además, partiendo de la premisa de que esa entesitis tiene su origen en el estrés mecánico, comprueban que en ratones suspendidos por la cola (suprimiendo así el estrés mecánico en las patas) la severidad de la inflamación en las entesis se reduce significativamente (Jacques et al. 2014). Teniendo en cuenta que la entesopatía que se desarrolla en ese modelo es independiente de células T y B, cobran especial relevancia las **células del estroma**.

En conexión con esto, el descubrimiento de que las **entesis** albergan un **linaje de células T** relacionadas con la inmunidad innata y portadoras del **IL-23R** ha cambiado profundamente el concepto de la fisiopatología de la EspA. La activación de estas células, mediada por IL-23, conduce a la liberación de citocinas que causan y mantienen la inflamación y la remodelación ósea resultando en la anquilosis (Fig. 13). En el modelo de ratón usado en este revolucionario estudio de Sherlock y cols., el receptor de IL-23 marcado con un fluoróforo les permitió

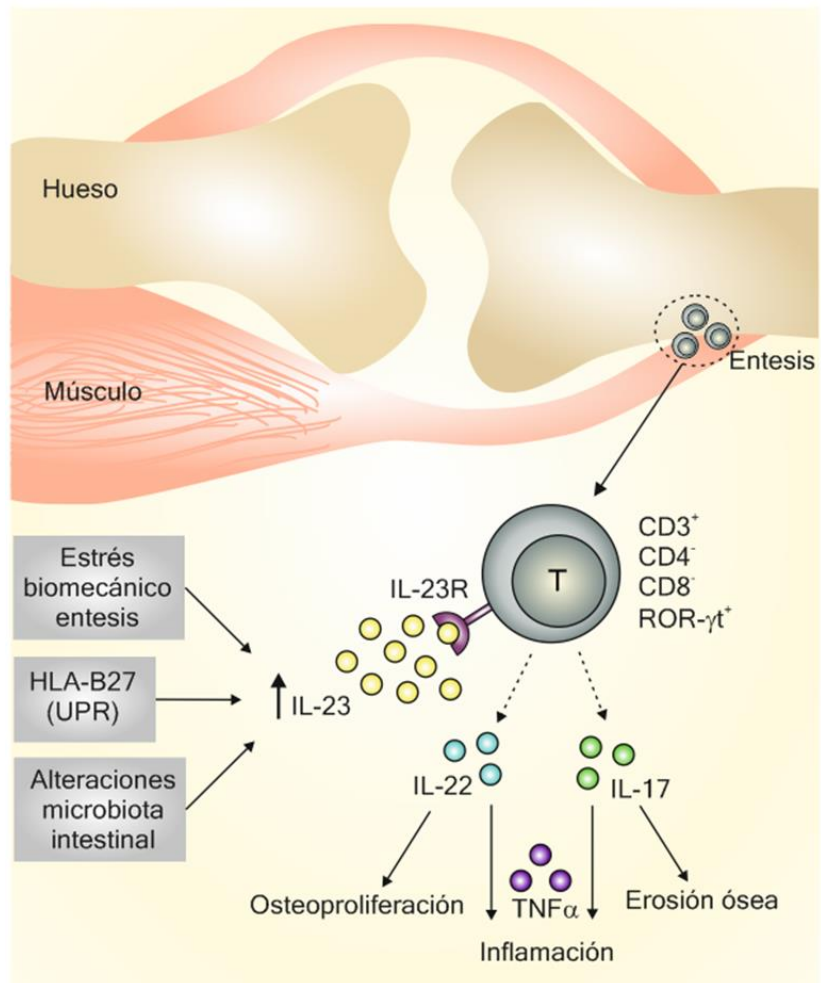


Figura 13. Las células T residentes en las entesis: su relación con eje IL-23/IL-17 y su importancia en la patogénesis de la EspA.

identificar una población de células T en la entesis con fenotipo **CD3⁺CD4⁻CD8⁻IL-23R⁺ROR-γt⁺**. En estos ratones, la inducción de la sobreexpresión de IL-23 es suficiente para provocar la entesitis y el proceso de remodelación ósea característicos de la EspA, a través de la liberación de IL-17 e IL-22 por parte de esas células T residentes (Sherlock et al. 2012). Una cuestión interesante derivada de este descubrimiento es si las células T residentes en la entesis pueden aportar luz en el debate sobre el origen autoinmune o autoinflamatorio de la EspA. A pesar de que no presentan marcadores de NK, sí expresan el

factor de transcripción PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*) que confiere una rápida capacidad de inducción de citocinas tras la activación de éstas células (Alonzo y Sant'Angelo 2011). Por tanto, podrían considerarse células T de tipo innato que actúan como sensores de daño y estrés.

Sin duda la traslación de estos conceptos desde el modelo animal al ser humano es aún un reto a afrontar. El uso del **ejercicio** y la **fisioterapia** como tratamiento eficaz en la EspA y datos recientes, que apuntan a que la severidad de la enfermedad está influenciada por factores biomecánicos, comprobándose que profesiones con mayor demanda física sufren mayor progresión radiológica de la enfermedad (Ramiro et al. 2015a), pueden contribuir a enfrentar este reto.

3.2.2.2. EL EJE IL-23/IL-17 EN LA EspA

La **IL-23** es una citocina que ejerce potentes acciones **proinflamatorias** y tiene un papel crucial en la diferenciación, supervivencia y expansión de las **células Th17** caracterizadas por la producción de **IL-17**, otra citocina clave en la inflamación. Estos hechos han abierto un nuevo campo en la investigación en torno a las enfermedades reumáticas y la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos dirigidos hacia el eje IL-23/IL-17 (Gaffen et al. 2014, Sherlock et al. 2015a).

A lo largo de los apartados anteriores se han ido esgrimiendo abundantes razones por las cuales la IL-23 se considera una citocina clave en la patogénesis de la EspA. Por un lado, los **estudios genéticos** han demostrado la asociación entre los polimorfismos en el **receptor de IL-23** y la enfermedad (Wellcome Trust Case Control et al. 2007). Por otra parte, se ha manifestado su **relación con HLA-B27** a través de la teoría del plegamiento anómalo y de la formación de homodímeros aberrantes que conducen a estrés celular y con ello a la activación de la UPR (DeLay et al. 2009, Colbert et al. 2010), produciéndose un incremento en los niveles de IL-23 que a su vez activa a las células Th17, altamente respondedoras a esta citocina (Bowness et al. 2011). De hecho, en el líquido y tejido sinovial de pacientes con artritis psoriásica (APs) se ha observado un marcado incremento de células Th17, IL-17 y su receptor (IL-17R) y, simultáneamente, un incremento en los niveles de IL-23 que correlaciona con la severidad de la enfermedad (Raychaudhuri y Raychaudhuri 2016). En la misma línea, estudios en pacientes con espondilitis anquilosante revelan incrementos séricos en los niveles de IL-23 e IL-17 (Mei et al. 2011). Además, la IL-23 está implicada en la patogénesis de la **inflamación intestinal**, observándose que la inflamación subclínica del íleo hallada en los pacientes con EspA está directamente relacionada con la producción de dicha citocina (Ciccia et al. 2009).

Finalmente, el descubrimiento de la presencia de **células T** residentes en las **entesis** que expresan el **IL-23R** viene a confirmar su implicación en el origen de la entesitis y posiblemente en los procesos de erosión y también de neoformación ósea (Sherlock et al. 2012, Sherlock et al. 2015b). El primer proceso podría estar mediado por IL-17, que regula positivamente la expresión de RANKL en células T, promoviendo la osteoclastogénesis (Koenders et al. 2005), mientras que la formación de hueso estaría asociada a la **IL-22**, inducida por parte de la propia IL-23 (Sherlock et al. 2012) (Fig. 14).

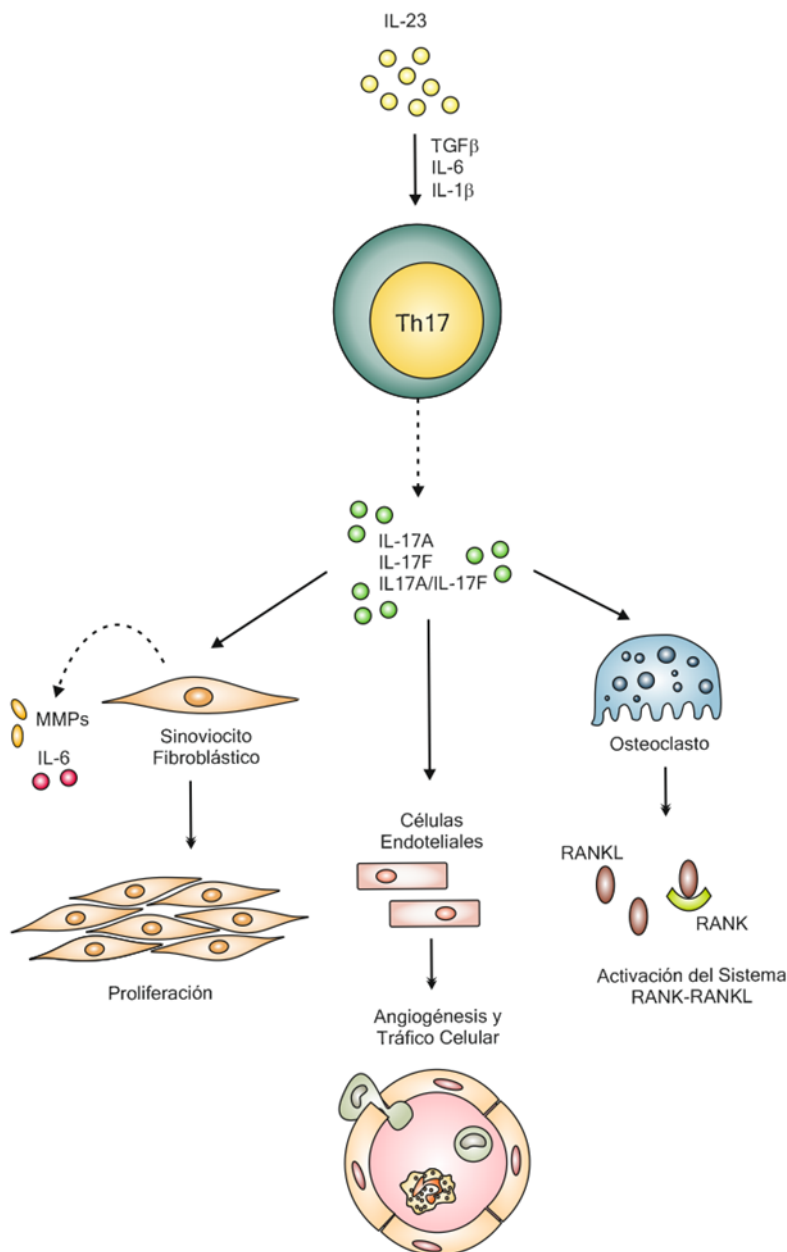


Figura 14. El eje IL-23/IL-17 en la patogénesis de la EspA.

Dado que esta citocina parece muy implicada en la patogénica de la enfermedad, es esperable que el tratamiento de **inhibición** de la IL-23 no solamente actúe sobre rasgos sintomáticos de la enfermedad sino también sobre las causas primarias de la misma logrando su modificación (Sherlock et al. 2015b).

3.2.2.3. OTRAS CÉLULAS Y CITOCINAS IMPLICADAS EN LA PATOGÉNESIS DE LA EspA

Como hemos comentado con anterioridad, los estudios genéticos de GWAS han permitido identificar polimorfismos en **citocinas**, en sus receptores o en moléculas de sus vías de señalización intracelular, asociados a la patogénesis de las EspA. Junto con la IL-23 y la IL-17, otras citocinas con un papel relevante son TNF, IL-1 e IL-6 (Hreggvidsdottir et al. 2014).

En el caso de **TNF**, hemos visto que se han descrito asociaciones con su vía de señalización a través de **TNFRSF1A** (receptor transmembrana de TNF), **TRADD** y **TNFSF15** (superfamilia de citocinas con acción proinflamatoria) (Zinovieva et al. 2009, Pointon et al. 2010, Davidson et al. 2011). En humanos, esta citocina es producida por una gran variedad de células y ejerce sus funciones sobre otras tantas. Su evidente implicación en la patogénesis de la EspA se refuerza por el **éxito** de la aplicación de terapias de **inhibición de TNF** con anticuerpos o receptores solubles recombinantes, que reducen los signos y síntomas de la inflamación en EspA axial y periférica (Paramarta y Baeten 2014). Sin embargo, todavía es necesario profundizar en el conocimiento de qué forma de TNF (soluble o de membrana), qué receptor (TNFR1 o TNFR2) y qué células diana son las que contribuyen de forma específica a la enfermedad en humanos (Hreggvidsdottir et al. 2014).

La EA muestra asociaciones genéticas significativas con polimorfismos en varios genes de la vía de la **IL-1**, especialmente con el receptor **IL-1R2** (que, tras escindirse de la membrana por acción de enzimas como ERAP1, actúa como señuelo bloqueando la unión de la IL-1 al receptor IL-1R1) y con **IL-1RN**, antagonista del receptor 1 (Sims et al. 2008, Lea y Lee 2012). Sin embargo, las evidencias de su implicación en la patogénesis de la EspA, tanto en modelos animales (ratón *knock out* para IL-1Ra, antagonista del receptor IL-1R) como en bloqueo *in vivo* de la señalización de la IL-1 en humanos, no han proporcionado resultados concluyentes por el momento.

En el caso de la **IL-6**, su asociación genética con la EA estaría mediada por la presencia de polimorfismos de riesgo en STAT3, molécula que interviene en la señalización intracelular de IL-23 e IL-6. Aunque se han observado niveles elevados de IL-6 en pacientes con EA, su asociación con la actividad y progresión de la enfermedad no parece clara. Además, el tratamiento con inhibidores de esta citocina no ha resultado eficaz, de modo que no parece que tenga un papel fundamental en la patología (revisado por (Hreggvidsdottir et al. 2014).

Junto con el destacado papel de los linfocitos Th17 y de las células T residentes en las entesis, otros posibles **componentes celulares** podrían unirse al complejo puzzle que subyace a la patofisiología de la EspA.

Las células Treg y las CD juegan un papel esencial en el control de la respuesta inmune. Así, siendo la desregulación inmune un eje central en la EspA, cabe pensar que estas células puedan estar implicadas en su desarrollo. En el líquido sinovial de pacientes con EA se observan niveles elevados de **células Treg** en comparación con la sangre periférica, apuntando al reclutamiento de estas células hacia las zonas de inflamación. Además, parece existir una correlación negativa entre la frecuencia de estas células y los niveles séricos de PCR, sugiriendo que las Treg modularían la inflamación en pacientes con EspA (Appel et al. 2011). Por otro lado, las **células dendríticas** de pacientes con EA tras estimulación vía TLR son capaces de producir IL-23, pudiendo conducir a la diferenciación de las células T naive hacia el fenotipo patogénico Th17 (Prevosto et al. 2012).

En lo relativo a las células de la inmunidad innata, el número de **macrófagos** presentes en la sinovia inflamada correlaciona con la actividad de la enfermedad en la EspA, existiendo además una elevada expresión de CD136, marcador característico de los macrófagos **antiinflamatorios-M2**, con actividad inmunomoduladora. Las consecuencias de esa polarización preferente hacia M2 son todavía inciertas, si bien existe una correlación entre el número de células CD136⁺ y la positividad de HLA-B27, así como con la alteración en la activación de los linfocitos (Baeten et al. 2004). Por otro lado, las **células NK** se encuentran en niveles elevados en pacientes con EA y además presentan una alta expresión del receptor de superficie **KIR3DL2**, que como ya hemos comentado reconoce las formas aberrantes de HLA-B27 (Chan et al. 2005). Aunque el mecanismo patogénico que subyace a la interacción entre HLA-B27 y los receptores KIR aún es incierto, el análisis de células TCD4⁺ KIR3DL2⁺ ha demostrado que muestran un fenotipo Th17 patogénico (Bowness et al. 2011).

Por último, estudios recientes han introducido en la ecuación a las **células T $\gamma\delta$** . Las $\gamma\delta$ son una subpoblación de células T CD3⁺ que expresan un TCR formado por cadenas γ y δ en lugar del receptor canónico $\alpha\beta$. Estas células se dividen a su vez en subgrupos, uno de los cuales comparte características similares a los linfocitos Th17 y es productor de IL-17 (Al-Mossawi et al. 2013). Un estudio reciente ha demostrado que en los pacientes con EA los niveles de células $\gamma\delta$ circulantes son 3 veces mayores que en controles sanos. Además, el porcentaje de esas $\gamma\delta$ que expresan el receptor de IL-23 es 5 veces superior, sugiriendo por primera vez que éstas podrían ser las principales productoras de IL-17 en la EspA (Kenna et al. 2012).

3.2.3. ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN LA EspA: EROSIÓN Y ANQUILOISIS

Una de las cuestiones clave en la fisiopatología de la EspA es cómo se produce la interacción entre la inflamación y la remodelación estructural, caracterizada por dos procesos: la

erosión ósea y la **osteoproliferación**, que conduce a la **anquilosis**. Ambos procesos ocurren de forma simultánea en las mismas articulaciones, si bien las erosiones óseas en el caso de las EspA son menos agresivas que en la AR y el papel predominante en la patología lo desempeñan los mecanismos de remodelación ósea (Dougados y Baeten 2011, Hreggvidsdottir et al. 2014).

Estudios recientes apuntan a que en la neoformación ósea ocurrida en la EspA (especialmente en las formas axiales), tendría un papel clave la **vía canónica de señalización de Wnt**, así como sus inhibidores naturales, la esclerostina y la proteína Dickkopf-1 (DDK-1) (Xie et al. 2016) (Fig. 15). Dicha vía es esencial en la homeostasis del hueso, controlando la proliferación, diferenciación y función de los osteoblastos. En ella,

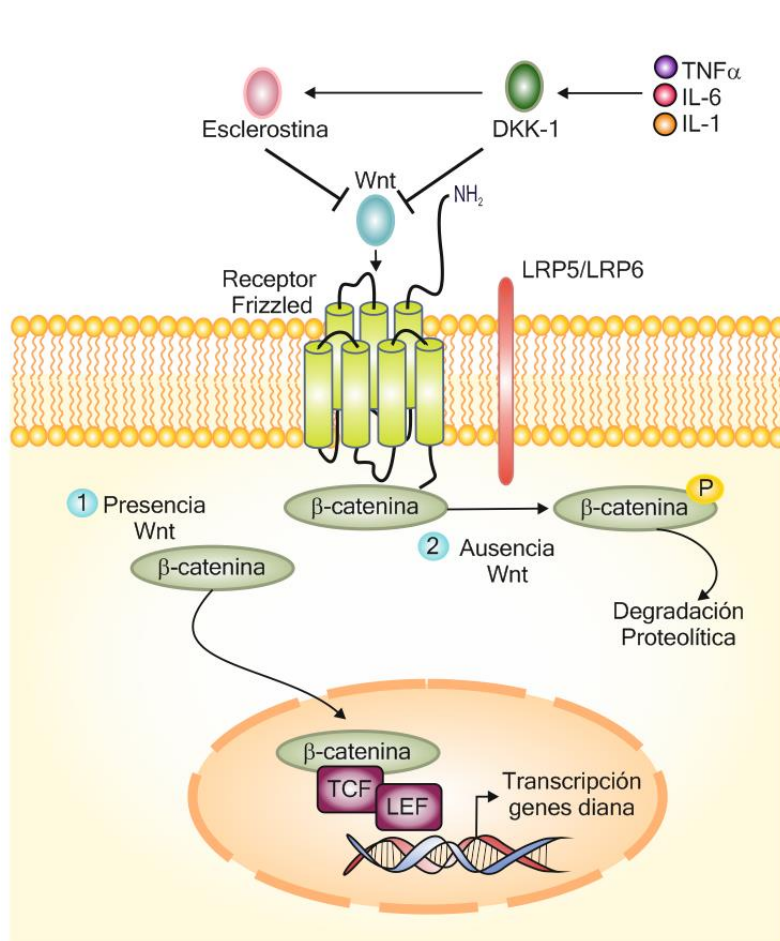


Figura 15. Vía canónica de señalización Wnt/β-catenina: En presencia de Wnt (1) la β-catenina se transloca al núcleo promoviendo la expresión de los genes diana. En ausencia de Wnt (2) o bien en presencia de sus inhibidores naturales DDK-1 y Esclerostina, la β-catenina es fosforilada y degradada en el proteosoma.

Wnt ejerce su acción a través del complejo co-receptor formado por una proteína relacionada con el receptor LRP5/6 de lipoproteínas de baja densidad y un receptor *frizzled* (Fz). Su unión a este co-receptor conlleva la traslocación de la **β-catenina** al núcleo y su unión a factores de transcripción TCF/LEF, regulando la expresión de genes relacionados con la diferenciación o función del osteoblasto (Moon et al. 2002, Westendorf et al. 2004, Glass et al. 2005).

La proteína **DKK-1**, inhibidora de Wnt, ha sido reconocida como un protagonista clave en la formación de nuevo hueso en pacientes con EA. En modelos animales, la activación de Wnt mediante el bloqueo de DKK-1 conduce a la formación de osteofitos en articulaciones periféricas (Diarra et al. 2007); así mismo, ratones deficientes para DKK-1 (*Dkk1*^{+/-}) muestran un incremento de masa ósea y de formación de hueso (Morvan et al. 2006). En pacientes con EA, se han descrito niveles séricos reducidos de DKK-1 (Diarra et al. 2007) que además parecen no ser plenamente funcionales ya que se muestran incapaces de suprimir de forma tan eficiente la traslocación de la β -catenina al núcleo como en los controles sanos (Daoussis et al. 2010). En esta misma línea, en una cohorte alemana de EA de inicio, han observado que pacientes con niveles más bajos de DKK-1 son más propensos a la formación de sindesmofitos, mientras que pacientes con niveles elevados parecen estar protegidos frente a dicha formación (Heiland et al. 2012). La **esclerostonina**, otro inhibidor natural de Wnt y también de la señalización a través de la proteína morfogénica ósea (**BMP**, *bone morphogenetic protein*) parece igualmente encontrarse en niveles reducidos en pacientes con EA (Appel et al. 2009). El desarrollo de un modelo de ratón con activación condicional del gen de la β -catenina en cartílago sugiere que la activación de esta vía en dicho tejido sería un evento clave en las alteraciones estructurales de columna y articulaciones que se producen en los pacientes con EspA (Xie et al. 2016).

Las alteraciones estructurales observadas en la EspA se muestran en la [figura 16](#).

El proceso de destrucción de hueso y cartílago en la EspA es muy similar al que se produce en la AR, con la implicación del sistema RANK/RANKL/OPG (Vandooren et al. 2008, Vandooren et al. 2009), y por tanto parece ser contrarrestado eficazmente con tratamientos antiinflamatorios como el anti-TNF. Sin embargo, estos no son eficaces deteniendo la formación de hueso axial y periférica (Finzel et al. 2013). Por esta razón, para explicar la compleja relación entre la inflamación y la neoformación de hueso se han desarrollado distintas **hipótesis**.

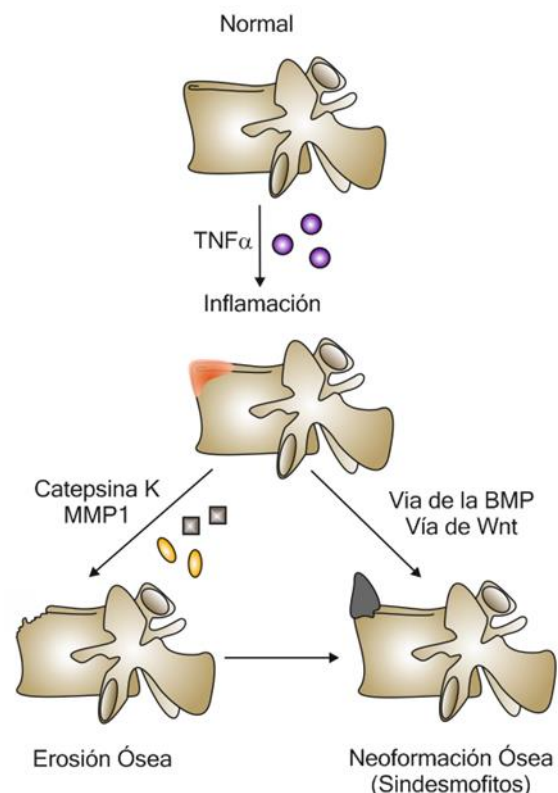


Figura 16. Alteraciones estructurales ocurridas como consecuencia de la EspA.

Por un lado, la **osteoproliferación** podría explicarse por la propia naturaleza **intermitente** de la **inflamación**. Así, según la hipótesis del “**freno-TNF**”, en una fase temprana, el incremento de TNF conduciría de forma simultánea a la destrucción del hueso y la inhibición del proceso de remodelación a través de la regulación al alza de DDK-1. Sin embargo, la disminución de TNF en una fase tardía liberaría el bloqueo de la vía Wnt y las erosiones producidas anteriormente activarían ahora la osteoproliferación (Diarra et al. 2007, Sieper et al. 2008). Esa fluctuación daría lugar a una ventana de oportunidad en la que el bloqueo de la inflamación en estadios iniciales prevendría la formación de hueso, mientras que un tratamiento antiinflamatorio en etapas tardías podría tener un efecto perjudicial al incrementar la osteoproliferación. Esta hipótesis se ve apoyada por los estudios de Appel y cols. (Appel et al. 2009) comentados previamente. En contraposición, en modelos animales se ha descrito que la completa inhibición de la destrucción ósea mediada por inflamación no inhibe la osteoproliferación (Lories et al. 2008, Schett et al. 2009). Además, las observaciones clínicas a largo plazo en pacientes con EA indican que la terapia de bloqueo de TNF cuando la enfermedad está establecida no conduce a neoformación ósea (Baraliakos et al. 2014b).

Como alternativa a ésta, se ha propuesto también la hipótesis del “**estrés entesal**”, que explica la formación patológica de hueso desconectada de la inflamación (Lories et al. 2009). En este caso, una activación directa de vías de señalización de las células estromales, incluyendo la vía de la proteína BMP, conduciría a la formación de tejido nuevo independientemente a la inflamación y a las erosiones tempranas. El desencadenante de este proceso sería una señal de **daño o estrés mecánico** producido en las **entesis**. En este caso, una terapia precoz antiinflamatoria no sería suficiente para prevenir la anquilosis (Lories et al. 2007), sino que se requeriría tratamiento específico que tuviese como diana las vías de señalización estromales. Esta hipótesis se ha validado en modelos animales, donde el bloqueo de la vía de la BMP por transferencia de **noggin**, su inhibidor natural, previene el inicio y la progresión de la entesitis anquilosante (Lories et al. 2005). Sin embargo, aunque las imágenes de resonancia magnética muestran la formación de sindesmofitos en zonas de no inflamación, su aparición es más frecuente y probable en los bordes de vértebras inflamadas (Baraliakos et al. 2008) de modo que sí debe existir una conexión entre la inflamación y la osteoproliferación pero es posible que ésta no sea gobernada por TNF sino por otras citocinas. En este contexto, como ya hemos descrito en apartados anteriores, las células T presentes en las entesis que expresan el IL-23R y producen IL-22; tanto IL-23 como IL-22 son capaces de estimular vías de remodelación ósea como la de la BMP. En este sentido se ha demostrado que una terapia continua y potente con AINEs se asocia a disminución radiográfica de formación de hueso, sobre todo en

pacientes con niveles muy elevados de PCR (Kroon et al. 2012) apoyando el concepto de que vías inflamatorias distintas a las de TNF están implicadas en la neoformación de hueso. Además, recientemente se ha descubierto que pacientes con EA presentan títulos de autoanticuerpos contra noggin y contra esclerostina mucho más elevados que los controles sanos (Tsui et al. 2014).

3.3. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA EspA

La **heterogeneidad** en las manifestaciones de la EspA dificulta no solamente su **clasificación** sino también su **evaluación clínica**. La existencia de distintas **presentaciones clínicas** (axial, periférica, entesopatía y extra-articular) obstaculiza la evaluación de la EspA como un todo, especialmente en los pacientes que combinan distintas manifestaciones de la enfermedad de forma simultánea. El manejo óptimo de la EspA requiere abordar sistemáticamente varios interrogantes: si el paciente **sufre realmente** la enfermedad, de **qué forma** de EspA se trata, si la enfermedad **está activa**, si es **severa** o potencialmente severa y si es **refractaria** al tratamiento (Dougados y Baeten 2011, Paramarta y Baeten 2014).

3.3.1. CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN EN LA EspA

A lo largo de varias décadas se ha producido un gran progreso en el reconocimiento, diagnóstico y clasificación de las EspA. Si nos remontamos a 1961, encontramos el primer intento de clasificación de la EA en los llamados “**Criterios de Roma**”. Poco después, en 1966, se publicaban los “**criterios de Nueva York**” con su posterior **modificación** en 1984. Pero esta clasificación presentaba grandes limitaciones, centrándose en las formas axiales de la enfermedad, con manifestación sacroilíaca obligatoria, imposibilitando la identificación de las demás. Ya en la década de los 90 aparecieron los “**Criterios Amor**” y los criterios del *European Spondyloarthritis Study Group* (**ESSG**), donde por primera vez quedaba recogido todo el espectro de las EspA, incluyendo formas indiferenciadas (Garg et al. 2014).

Las mejoras y el uso más extendido de técnicas de imagen, como la resonancia magnética, permitieron comprobar que la lesión estructural de las articulaciones sacroilíacas puede manifestarse tardíamente en los estudios radiológicos, pudiendo pasar varios años desde el verdadero inicio de la enfermedad. Surgió entonces una nueva clasificación mediante los criterios de la *Assessment of Spondyloarthritis international Society* (**ASAS**) que buscaba incluir a los pacientes con enfermedad precoz sin daño radiológico. Además, estos criterios permitieron la división de las EspA en dos grupos, **axiales** y **periféricas**, en función de las características articulares predominantes en el momento de la manifestación clínica. En el

caso de la **EspA-axial** encontramos el espectro de las EspA con manifestación axial (espondilitis y sacroileitis) y en el caso de la **EspA-periférica** hallamos el espectro de EspA con afectación fundamental del esqueleto periférico (artritis periférica, entesitis y dactilitis). A su vez, los pacientes con EspA-axial son sub-clasificados como **EspA-axial radiológica** (equivalente a EA establecida) y **EspA-axial no-radiológica** según la presencia o ausencia de sacroileitis definida (Rudwaleit et al. 2009b, Rudwaleit 2010, Raychaudhuri y Deodhar 2014) (Fig. 17).

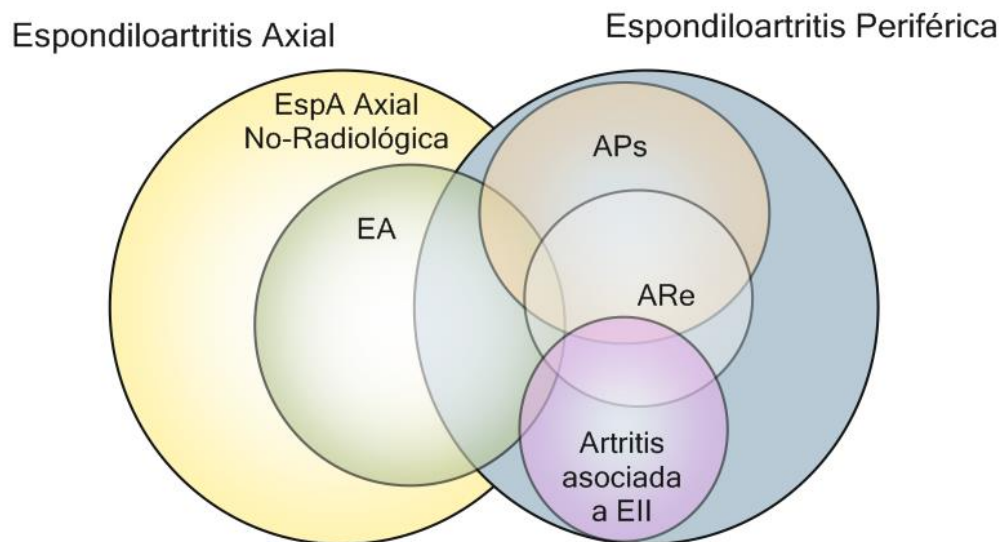


Figura 17. Concepción actual del espectro de la EspA. EA: espondilitis anquilosante; APs: artritis psoriásica; ARe: artritis reactiva; EII: enfermedad inflamatoria intestinal. (Adaptada de Raychadhuri *et al.*, 2013).

Si bien estos criterios han supuesto grandes ventajas frente a sus predecesores, todavía implican algunas **limitaciones**, a saber: la clasificación está establecida para facilitar la investigación clínica pero no tanto el diagnóstico; la subdivisión en formas axiales y periféricas no siempre se refleja en la realidad clínica ya que un 30% de los pacientes presentan manifestaciones combinadas. Por último, sería necesario afinar más la clasificación de los subgrupos para comprobar cuáles son las diferencias en cuanto a la actividad de la enfermedad, la evolución a largo plazo y, sobre todo, la respuesta al tratamiento (Garg et al. 2014, Paramarta y Baeten 2014).

En cuanto al **diagnóstico** de estas enfermedades es complejo, dado el desconocimiento que existe aún en cuanto a su etiología. La evaluación de los pacientes se realiza de acuerdo con la **historia clínica**, siendo de vital importancia la edad de inicio de los síntomas y conocer la existencia de antecedentes, dada la elevada **agregación familiar** de estas patologías. Además, se realiza la **exploración física** del esqueleto axial, articulaciones periféricas,

valoración de entesitis y dactilitis. La determinación de los niveles de **PCR** y **VSG**, así como de la presencia de **HLA-B27**, son igualmente fundamentales. Pero el mayor avance en el diagnóstico de estas patologías se ha producido de la mano de las **técnicas de imagen**. Las imágenes de resonancia magnética (**IRM**) de las articulaciones sacroilíacas y espinales han mejorado de forma sustancial la capacidad de diagnóstico temprano, especialmente en las formas de EspA axial, tanto no-radiológica como EA. De hecho, los nuevos criterios ASAS incluyen las IRM para ayudar a una mejor clasificación de los pacientes con predominancia de manifestaciones axiales tempranas o predominancia de manifestaciones periféricas (Poddubnyy y Rudwaleit 2012, Braun et al. 2015).

3.3.2. MEDIDAS DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD, FUNCIONALIDAD Y SEVERIDAD EN LA EspA

En la EspA, la **actividad de la enfermedad** hace referencia a la **inflamación** causada por la misma. En la práctica clínica diaria dicha actividad es valorada mediante el índice **BASDAI** (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*), que consiste en un conjunto de preguntas para la autoevaluación del paciente basadas en el grado de fatiga, los síntomas axiales y periféricos, la entesopatía y la duración e intensidad de la rigidez matutina (Garrett et al. 1994). Dado que este índice mide únicamente parámetros subjetivos, hace unos años se desarrolló el índice **ASDAS** (*Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*) que, además de algunas de las preguntas del BASDAI, incluye medidas de los reactantes de fase aguda (Lukas et al. 2009). Estos índices pueden subestimar la actividad en aquellos pacientes que presentan manifestaciones combinadas de la enfermedad. En esos casos, la determinación de dicho parámetro mediante **evaluación global de la actividad de la enfermedad** llevada a cabo por el paciente y por el médico podría ser más precisa (Paramarta y Baeten 2014).

Además de la evaluación clínica de la actividad de la enfermedad determinada mediante los índices anteriormente expuestos, las **imágenes por resonancia magnética** de la columna y las articulaciones sacroilíacas también pueden servir en la evaluación de la actividad como medida de la inflamación (Madsen y Jurik 2010). De hecho, la **severidad** de la enfermedad hace referencia al **daño estructural irreversible** causado por la misma y existe un **sistema de puntuación radiológico** para evaluar ese daño a nivel axial, el **mSASSS** (*modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score*) (van der Heijde y Landewe 2005).

Junto con el dolor y la rigidez, uno de los problemas más graves de los pacientes con EspA es la discapacidad funcional. La evaluación de la **funcionalidad física** se realiza mediante el índice **BASFI** (*Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*) que valora flexión, alcance, cambio de posición, pie, giro y escalada, así como la capacidad de los pacientes para hacer

frente a la vida cotidiana (Calin et al. 1994). Además, se emplea también el cuestionario HAQ modificado para espondiloartropatías (**HAQ-S**) (Daltroy et al. 1990).

Dado que el daño estructural y la discapacidad funcional son fenómenos irreversibles, uno de los puntos clave en el manejo de la EspA es la **predicción del curso natural** de la misma, en cada paciente, en los estadios iniciales. Igualmente, evaluar si la enfermedad es **refractaria al tratamiento**, de acuerdo con las recomendaciones ASAS y EULAR, es clave para alcanzar el éxito terapéutico con tratamientos de segunda línea (Dougados y Baeten 2011).

3.4. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LA EspA

El **objetivo** clásico en el tratamiento de la EspA es **mejorar** la condición del paciente en lo relativo al **dolor** y la **discapacidad** funcional, así como conseguir la **remisión/baja actividad** de la enfermedad y **prevenir** el posterior deterioro clínico (Dougados y Baeten 2011).

Las **recomendaciones** para el tratamiento de las distintas formas de EspA (axial y periférica) así como para sus distintos fenotipos (espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, reactiva etc.) han sido actualizadas en 2010 por la **ASAS/EULAR** y en 2015 por el **ACR/SAA/SPARTAN** (*American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network*). Resumidamente, en las formas de EspA-axial, los **AINEs** (como el naproxeno, el ibuprofeno o el diclofenaco) constituyen la **primera línea** de tratamiento, mientras que los **inhibidores de TNF** (Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Golimumab y Certolizumab pegol) están indicados como **segunda línea** para los pacientes que no han respondido a AINEs o como primera para aquellos en que éstos estén contraindicados. En el caso de las formas de EspA-axial no radiológica, únicamente se recomienda el uso de anti-TNF cuando existen evidencias radiológicas de inflamación o niveles elevados de PCR. El tratamiento de las formas periféricas de EspA (excepto de la APs) se limita actualmente a AINEs, **glucocorticoides** y **FAMEs** convencionales (metotrexato, leflunomida o sulfasalazina), pero la terapia biológica no está indicada para esos casos. Además, dejando a un lado las terapias farmacológicas, el **ejercicio** y la **fisioterapia** han sido y continúan siendo aspectos importantes del tratamiento de la EspA (Braun et al. 2011, Ward et al. 2016).

A pesar de que la implantación de las terapias de **bloqueo de TNF** revolucionó el cuidado de los pacientes con EspA, este tratamiento **no es efectivo** en un **40%** de los mismos y además está contraindicado en muchos casos (van der Heijde et al. 2005, van der Heijde et

al. 2006). Por otro lado, el bloqueo de TNF no parece inducir remisión a largo plazo sino que la mayoría de pacientes presentan, tras la interrupción del tratamiento, tasas de recaída de 2 meses, tanto en EspA axial (Baraliakos et al. 2005, Song et al. 2012) como periférica (Paramarta et al. 2013). Finalmente, ya hemos comentado que la terapia con anti-TNF detiene la destrucción del hueso (van der Heijde et al. 2007) pero existe una notable controversia en cuanto a si es capaz (Baraliakos et al. 2014b) o no (van der Heijde et al. 2009) de evitar o ralentizar la neoformación ósea. En conjunto se llega a la conclusión de la **necesidad de desarrollo de terapias alterativas** a la inhibición de TNF en la EspA.

Se ha probado la eficacia en la EspA de otras **terapias biológicas**, tales como Anakinra (antagonismo del IL-1R), Abatacept (modulación de células T), Rituximab (depleción de células B) o Tocilizumab (bloqueo del IL-6R); pero ninguna ha generado resultados mejores que los obtenidos con el uso de placebos (revisado por (Sieper y Poddubnyy 2016). Sin embargo, terapias que tienen como diana el **eje IL-23/IL-17** sí parecen estar dando buenos resultados en EspA axial, concretamente en EA. En el caso del **Secukinumab**, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la IL-17, se ha observado que conduce a una clara mejoría en los signos y síntomas de la EA activa tras dos años de terapia, conduciendo además a una regresión de la inflamación espinal y a una baja progresión radiológica (Baeten et al. 2015, Baraliakos et al. 2016, Braun et al. 2017). Estos resultados convierten al Secukinumab en el primer agente biológico con clara eficacia en un ensayo en fase III en pacientes con EA que fracasaron a la terapia de bloqueo de TNF. Por otro lado, ensayos con **Ustekinumab**, anticuerpo dirigido contra la subunidad p40 de la IL-12 y la IL-23, demuestran que su administración también reduce los signos y síntomas de la EA activa (Poddubnyy et al. 2014b).

Recordemos que la estrategia terapéutica conocida como “**treat to target**” implica el seguimiento frecuente de los signos y síntomas de la enfermedad adaptando el tratamiento a los cambios observados con el fin de alcanzar un objetivo terapéutico prefijado, en contraposición al enfoque tradicional del manejo de la enfermedad sin establecer hitos específicos. Así como en el caso de la AR esta estrategia está bien definida, en el caso de la **EspA** existe cierta **controversia** (Schoels et al. 2014, Danve y Deodhar 2017). Definir una estrategia terapéutica basándose en la evidencia de qué respuesta consigue alcanzarse en función de qué tratamiento se establece tiene dos objetivos principales. Por un lado, lograr un **nivel suficiente de respuesta** al tratamiento para mantener la enfermedad bajo control y evitar secuelas mayores. En segundo lugar, cuando la respuesta del parámetro a evaluar es difícil de medir, como ocurre con el daño estructural, el objetivo es **definir y validar otro parámetro** más sensible cuya actuación pueda servir como fiel reflejo de la del primero

(Maksymowych 2013). Ambos objetivos son más difíciles de conseguir en la EspA que en la AR.

En 2014 un grupo de expertos internacionales hizo una propuesta para el T2T en las distintas formas de manifestación de la EspA (axial, periférica, APs, etc.) (Smolen et al. 2014a). La base conceptual de dicha proposición reside en que el tratamiento de la inflamación lleva a la mejora de todos los *outcomes* de la enfermedad y en que los índices de actividad de la enfermedad son objetivos adecuados para guiar el tratamiento. En cuanto a la primera afirmación, ya hemos valorado las discrepancias que existen en cuanto a si el tratamiento de la inflamación, principalmente por bloqueo de TNF, es capaz o no de evitar la progresión radiológica. Respecto a la segunda, hemos visto que índices como el BASDAI y el ASDAS, si bien se usan para monitorizar la enfermedad en cuanto a signos y síntomas, no han demostrado tener ninguna capacidad prediciendo la progresión radiológica de la misma. Por tanto, un claro obstáculo al T2T en EspA es la falta de marcadores subrogados validados para evaluar la respuesta al tratamiento del daño estructural al corto plazo (Maksymowych 2013).

Por otra parte, la **definición** de los conceptos **remisión** y **recaída** también supone una limitante al establecimiento del T2T dada la falta de consenso al respecto. En lo relativo a la **remisión**, clínicamente un ASDAS inactivo puede ser un buen evaluador; sin embargo, no aporta información determinante de lo que ocurre a nivel estructural ni extra-articular (Sieper 2012). El grupo de Smolen propone que la diana del tratamiento sea la remisión clínica en términos de ausencia de inflamación y síntomas (Smolen et al. 2014a), pero no existen parámetros clínicos que reflejen la histopatología de la inflamación (Maksymowych 2013). Por tanto, una diana más adecuada podría ser la **restauración de la funcionalidad**, puesto que esta solo se puede alcanzar en estado de remisión clínica y cuando, además, se ha podido prevenir el daño estructural (Sieper 2012). Respecto a la definición de **recaída**, el grupo de expertos del T2T la definen como el mantenimiento de la remisión o, al menos, la baja actividad. Sin embargo, no están aun completamente determinados los umbrales de variación de los distintos índices que pueden definirla como tal (Godfrin-Valnet et al. 2015).

En resumen, los mismos tratamientos (*treat*) y dianas (*target*) que hacen factible la aplicación del T2T para el control de los síntomas de la EspA son a la vez insuficientes cuando el objetivo a controlar es el daño estructural. Sin embargo, los esfuerzos en el diagnóstico precoz de la EspA y administración temprana de fármacos anti-TNF y/o AINEs, la disponibilidad de nuevas opciones terapéuticas dirigidas al eje IL-17/IL-23 y la evaluación de otras posibles dianas complementarias como el BASFI o el mSASSS abren la

puerta a nuevos estudios que podrán arrojar más luz sobre este tema en un futuro cercano (Danve y Deodhar 2017).

3.4.1. LA ESPONDILOARTITIS TEMPRANA Y LA VENTANA DE OPORTUNIDAD

Clásicamente, el tiempo comprendido entre el inicio de los síntomas de la EspA y su diagnóstico se encontraba en torno a los 8 años de media. Ese considerable retraso en la diagnosis y, por tanto, en el manejo de la enfermedad suponía un impacto muy perjudicial no solo a nivel personal para el paciente y para el curso de la enfermedad sino también a nivel socio-económico (Wendling et al. 2013).

El concepto de la **ventana de oportunidad**, tal como lo estudiamos en la AR, requiere en primer lugar la definición de “**etapa temprana**” de la enfermedad. Determinar el periodo temporal durante el cual la EspA se considera temprana es complejo y, en el caso de la EA, al ser una enfermedad caracterizada por una sacroileitis establecida que solo se hace detectable tras varios años desde el inicio de la enfermedad, este concepto es directamente inviable. Por tanto, la ventana de oportunidad solo es aplicable a la **EspA axial no-radiológica** y a la **EspA periférica** (Claudepierre 2014).

La detección de la ventana de oportunidad en la EspA axial no-radiológica permitiría, en primer lugar, **prevenir o ralentizar el daño estructural** debido a los procesos de remodelado del hueso. Si atendemos a la hipótesis de que la neoformación ósea está causada por la inflamación (Sieper et al. 2008, Lories y Haroon 2014) un tratamiento precoz supresor de la misma podría cambiar el curso de la enfermedad. El impacto de los inhibidores de TNF en la progresión radiológica en EspA ha sido difícil de resolver, en parte debido al ritmo relativamente lento del cambio radiológico. No obstante, a pesar de la controversia y de datos que apuntaban a que la progresión radiológica en la EA no podría detenerse mediante el tratamiento de **bloqueo de TNF** (Finzel et al. 2013), estudios observacionales en EspA axial han mostrado que existe una **disminución de la progresión** radiológica mediada por estos fármacos, especialmente cuando se aplican en **etapas iniciales** de la enfermedad y cuando el tratamiento se mantiene durante un periodo de tiempo más largo. Así, parece que el retraso en el establecimiento de terapia anti-TNF se asocia con una mayor progresión radiológica (Haroon et al. 2013).

En la misma línea, estudios de resonancia magnética muestran que la aparición de **sindesmofitos** es mucho más probable en **vértebras** en las que existen **lesiones inflamatorias** previas, apoyando el nexo entre la inflamación y la anquilosis (Maksymowych et al. 2009). Más aún, la neoformación de hueso es más probable en

lesiones inflamatorias avanzadas, ya que si la inflamación se ataja en etapas tempranas no llegan a iniciarse los procesos de reparación ósea que progresan hacia la anquilosis (Maksymowych et al. 2013), apoyando la idea de la ventana de oportunidad para la modificación de la enfermedad.

En segundo lugar, aplicar el concepto de ventana de oportunidad permitiría determinar el **periodo** durante el cual la **estrategia terapéutica** tendría **mayor probabilidad de éxito** en cuanto a proporción de pacientes respondedores, intensidad de respuesta y alcance de remisión (Claudepierre 2014). Los ensayos con inhibidores de TNF en EspA axial temprana, por ejemplo el estudio INFAST sobre el tratamiento con Infliximab en pacientes con duración de la enfermedad menor de 3 años, muestran tasas de respuesta mucho mayores que en pacientes con enfermedad establecida (Sieper et al. 2014a). Además, en lo relativo al periodo de **tiempo sin recaídas** tras la retirada del bloqueo TNF, tanto en EspA axial como en AS, la frecuencia de pacientes tratados en etapas iniciales de la enfermedad que permanecen en remisión sin recibir tratamiento es mucho mayor. Así, pacientes con EA establecida, 6 meses después de la retirada del fármaco sufren recaídas en un 90-100% de los casos (Baraliakos et al. 2005), mientras que pacientes con terapia precoz se mantienen en remisión tras 6 meses sin medicación en un 40-48% de los casos (Sieper et al. 2014b). Adicionalmente, se ha comprobado que aunque el bloqueo de TNF es capaz de reducir la carga sintomática independientemente del momento en que se administra, la **frecuencia** y **grado de respuesta** son sustancialmente mayores en los pacientes con una evolución de la enfermedad inferior a 5 años (Sieper et al. 2013). Además de los inhibidores de TNF, otros fármacos que parecen estar dando buenas respuestas en EspA axial cuando se administran en etapas tempranas de la enfermedad son los **AINEs** (Sieper et al. 2014a).

Todos estos hechos en conjunto muestran que la existencia de la ventana de oportunidad en la EspA axial es un hecho y que la intervención terapéutica temprana conlleva un mayor éxito en la modificación del curso de la enfermedad, redundando en menor progresión radiológica, mayor tasa de remisión y menor tasa de recaídas.

4. BIOMARCADORES

4.1. ¿QUÉ ES UN BIOMARCADOR?

El grupo de trabajo de definición de biomarcadores de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, *National Institutes of Health*) define **biomarcador** como *“una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”* (NIH-FDA 1998, Biomarkers Definitions Working Group 2001). En esta definición se incluyen tanto mediciones fisiológicas, como análisis de sangre, análisis moleculares de biopsias, datos genéticos o metabólicos y mediciones de imágenes.

Las **aplicaciones** de los biomarcadores son numerosas y variadas. Permiten la evaluación de los mecanismos de acción y **efectividad de los fármacos**, sirven como herramientas de **diagnóstico** y permiten el establecimiento de los criterios de valoración subrogados en los ensayos clínicos (Wagner y Atkinson 2015). Así, se encuentran en la vanguardia de la **ciencia traslacional** pudiendo impulsar importantes innovaciones en la práctica médica.

4.2. BIOMARCADORES EN ENFERMEDADES REUMÁTICAS: TIPOS Y APLICACIONES

En el campo de las **enfermedades reumáticas**, distintos marcadores serológicos y proteómicos se han incorporado ya a los criterios de clasificación de dichas enfermedades, contribuyendo al **diagnóstico precoz** de las mismas, la **subclasificación**, la evaluación de la **actividad de la enfermedad** y de la **respuesta a la terapia** (Mohan y Assassi 2015).

En función de su **naturaleza**, los biomarcadores pueden clasificarse en moleculares, de imagen y clínicos. Se entiende por **biomarcador molecular** cualquier variable bioquímica (proteínas, ácidos nucleicos y demás metabolitos en sangre, líquido sinovial y otros tejidos) cuya medición cuantitativa pueda servir como indicador de procesos normales o patológicos (valor diagnóstico) y de respuesta a tratamiento. **Biomarcadores de imagen**, tales como las IRM, los ultrasonidos y la tomografía por emisión de positrones/tomografía computada (PET/TC), son los que permiten la evaluación de la actividad de la enfermedad y la respuesta a tratamiento a través de la visualización de cambios anatómicos y estructurales. Finalmente, los **biomarcadores clínicos** son el conjunto de signos y síntomas, tales como el recuento de articulaciones inflamadas, las escalas de dolor, etc. que contribuyen al diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad establecida (Robinson y Mao 2016).

En lo relativo a su **relación con el proceso patológico**, los biomarcadores se pueden definir como descriptivos o mecánicos (Robinson et al. 2013). Un **biomarcador descriptivo** es aquel que refleja el estado de la enfermedad pero no está implicado en la patogénesis de la misma; tal es el caso, por ejemplo, de la PCR en la AR. En general no son parámetros específicos de la enfermedad y no median en la misma, por lo que su utilidad en el diagnóstico y pronóstico es muy restringida. Por el contrario, los **biomarcadores mecánicos** están arraigados al mecanismo biológico de la enfermedad, de modo que su potencial diagnóstico y de respuesta a terapia es elevado.

Desde el punto de vista terapéutico, los **biomarcadores predictivos** son fundamentales para guiar las decisiones clínicas y reducir los costes de la farmacoterapia, ya que permiten **identificar** a los individuos con mayor **capacidad de respuesta** a un terapia concreta antes de iniciarse ésta; mientras que los **biomarcadores farmacodinámicos** son los que se emplean para la **monitorización de la respuesta** a dicha terapia una vez se ha iniciado (Robinson y Mao 2016).

En los últimos **10 años**, la investigación en el campo de los biomarcadores se ha disparado asombrosamente, acumulando más de **470.000 citas** en PubMed, de las cuales más de **6.700** se corresponden con biomarcadores en **enfermedades reumáticas**. A continuación detallaremos los principales biomarcadores que existen en la actualidad para el manejo de la AR y la EspA (Fig. 18).

4.3. BIOMARCADORES EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

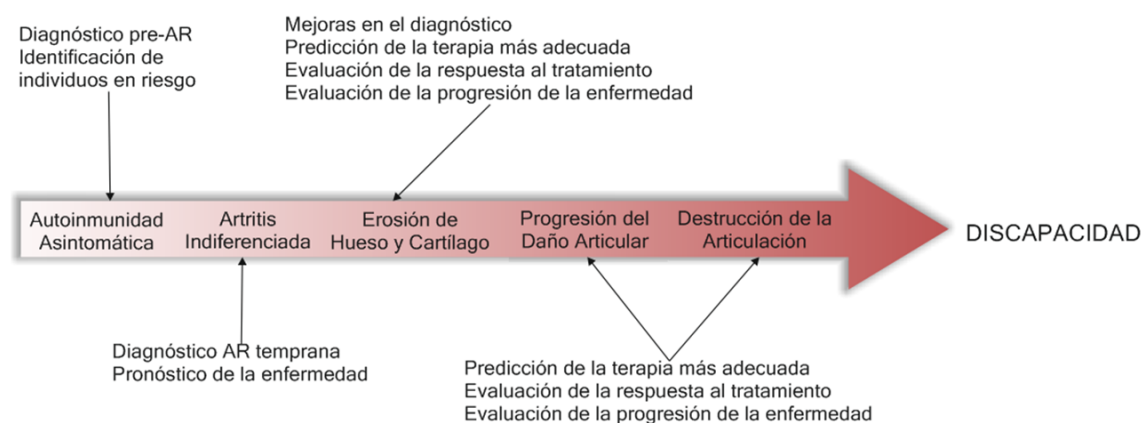


Figura 18. Principales usos clínicos de los biomarcadores a lo largo de las etapas de desarrollo de la AR.

Tal como hemos comentado anteriormente, la estrategia actual frente a la AR se centra en la **identificación e intervención tempranas** con el objetivo de **detener la evolución** de la enfermedad, **evitar la progresión** del daño estructural y aplicar **estrategias terapéuticas**

personalizadas. La consecución de todos estos objetivos hace imprescindible la búsqueda de **biomarcadores**, añadidos a los validados hasta la fecha, con **capacidad predictiva del desarrollo** de la propia AR, así como marcadores de **predicción de la progresión** estructural desde las etapas más tempranas de la enfermedad.

4.3.1. BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO EN LA AR

4.3.1.1. **AUTOANTICUERPOS:** FR, ACPA y OTROS

Los avances en el campo de los biomarcadores serológicos han sido tenidos en cuenta en los nuevos criterios ACR/EULAR de 2010 a través de la incorporación de 4 test que incluyen, junto con la **PCR** y **VSG**, la positividad para los autoanticuerpos **ACPA** y **FR** (Aletaha et al. 2010).

La presencia de **autoanticuerpos** en el suero de los pacientes con AR se conoce desde hace más de 70 años y su utilización como **biomarcadores de diagnóstico** de la enfermedad está ampliamente extendida. El **factor reumatoide** fue el primero en descubrirse y está presente en un 60-80% de pacientes con AR establecida, si bien, su especificidad no es demasiado elevada ya que se encuentra en un 15% de individuos sanos y en pacientes con otras enfermedades reumáticas (Nishimura et al. 2007) y su frecuencia es menor en artritis de reciente comienzo. Sin embargo, en un estudio prospectivo reciente se ha constatado que en la población general la presencia de títulos elevados del FR (>100 UI/ml) se asocia a un riesgo hasta 26 veces mayor de padecer AR a largo plazo (Nielsen et al. 2012).

En apartados previos se ha explicado que la modificación postraducciona de proteínas (citrulinación, carbamilación, etc.) es un proceso que ocurre usualmente en las células ante estímulos estresantes o inflamatorios. El comportamiento diferencial y patológico en el caso de la AR reside en la producción de anticuerpos dirigidos contra esas proteínas propias, probablemente como consecuencia de las características especiales que adquiere la región de unión al antígeno en presencia de determinadas variantes HLA-DR y que permiten la emergencia de autorreactividad (Firestein y McInnes 2017). En este contexto nos encontramos con los **anticuerpos contra proteínas citrulinadas**. En el diagnóstico de la AR, los **ACPA** tienen mayor **especificidad** (95%) y **sensibilidad** (70%) que el FR (Nishimura et al. 2007). Además de las proteínas citrulinadas, los péptidos cíclicos citrulinados (**CCP**) también pueden usarse como sustratos para detectar ACPA; de hecho, la prueba estándar empleada en la actualidad es la de los anti-CCP de segunda generación, una de las mejores en términos de sensibilidad y especificidad (van Venrooij et al. 2011). La presencia de los ACPA en suero precede incluso en varias décadas a la manifestación clínica

de la enfermedad y con el tiempo sus niveles se van incrementando hasta alcanzar su pico máximo en el momento de inicio de la misma. De forma simultánea a esta elevación de los niveles de ACPA se produce un incremento en los niveles de **citocinas** y **quimiocinas** que sugieren la existencia de una patología inflamatoria sistémica en curso y que se acelera gradualmente, pudiendo ser útil también como **marcador** diagnóstico (Deane et al. 2010, Firestein y McInnes 2017).

Como hemos visto, recientemente se ha descubierto un nuevo set de **autoanticuerpos dirigidos contra proteínas carbamiladas** (Shi et al. 2011). Los anti-CarP (IgG) están presentes en un 45% de los pacientes con AR, pero lo que resulta realmente interesante es que entre un 16% y un 30% (en función del isotipo IgA o IgG) de los pacientes ACPA- son anti-CarP⁺. Así, su independencia respecto al estatus de los ACPA le confiere una importante **capacidad predictiva** en la AR. Además, al igual que los ACPA, los anti-CarP permiten **identificar a individuos en riesgo** puesto que su aparición precede en varios años al diagnóstico de AR (Shi et al. 2014, Gan et al. 2015) observándose que en pacientes con artralgia la positividad para los anti-CarP tiene mayor probabilidad de progresión a AR, en un periodo de tiempo más corto y con independencia de los anti-CCP (Shi et al. 2013).

Finalmente, la vimentina es otra proteína que sufre citrulinación como modificación postraducciona y contra la cual se producen autoanticuerpos. Al parecer la antigenicidad de la vimentina se ve potenciada por cambios adicionales, de tal modo que en los ensayos para testar su validez diagnóstica se detectan **anticuerpos anti-vimentina citrulinada mutada** (anti-VCM). Los resultados de un meta-análisis de 14 estudios distintos evaluando su potencial como biomarcador han demostrado que la detección de anti-VCM podría ser un test de segunda línea para el **diagnóstico de individuos con sospecha** de AR que son **anti-CCP⁺ y FR⁺** (Luime et al. 2010).

4.3.1.2. **OTROS BIOMARCADORES CON CAPACIDAD DIAGNÓSTICA**

Junto con la presencia de autoanticuerpos, la desregulación inmune subyacente a la AR genera la aparición de otros biomarcadores moleculares. Un estudio de perfiles de expresión génica mediante *microarrays* muestra un incremento significativo en la expresión de genes asociados con la **inmunidad mediada por interferón tipo I** en pacientes con artralgia, independientemente del estatus de los ACPA (van Baarsen et al. 2010). El valor predictivo de la firma del IFN tipo I se ha validado posteriormente, comprobando que una expresión elevada de la misma predice el desarrollo de artritis dentro de un periodo de seguimiento de dos años (Lubbers et al. 2013). Además, se observó que en pacientes seropositivos la combinación de ACPA/FR con la firma del IFN era más predictiva del

desarrollo de AR que los ACPA/FR por sí solos; por tanto, este biomarcador **añade valor diagnóstico** al modelo.

De igual modo, existen evidencias recientes que apuntan a que la expresión de genes involucrados en la **inmunidad mediada por células B** también podrían tener una capacidad predictiva similar (Lubbers et al. 2015). En este caso, la expresión elevada de los genes que componen la firma de las células B se asocia con **protección frente** al desarrollo de **AR** en pacientes con artralgia.

4.3.2. BIOMARCADORES DE PRONÓSTICO, ACTIVIDAD Y DAÑO ESTRUCTURAL EN LA AR

En la AR predecir **la gravedad** del curso de la enfermedad permitiría guiar las decisiones de tratamiento personalizadas. Las herramientas disponibles para predecir dicha severidad son la evaluación clínica, las técnicas de imagen y los **biomarcadores serológicos**.

En cuanto a la serología, el **FR** y los **ACPA** son **marcadores** importantes en el **pronóstico** de la AR (Pratesi y Migliorini 2014) puesto que niveles elevados correlacionan con la erosión articular y mayor disfuncionalidad en términos de HAQ. La presencia basal de **FR** se asocia con el desarrollo de **formas más agresivas** de la enfermedad, mayores erosiones, persistencia de la sinovitis y necesidad de un tratamiento más intensivo (Pratesi y Migliorini 2014). Asimismo, la positividad basal de los **ACPA** predice **formas más severas** de AR como consecuencia de un mayor daño estructural articular, sinovitis persistente y disfunción física, así como por la frecuencia y gravedad de las manifestaciones extra-articulares (van der Helm-van Mil et al. 2005). Los pacientes ACPA⁺ muestran **erosiones articulares** más abundantes y precoces y, en la AR temprana, la presencia de los ACPA implica **mayor progresión radiológica** incluso en pacientes bajo tratamiento (Mustila et al. 2011). Dentro del repertorio de antígenos reconocidos por los ACPA, la **detección de especificidades finas** ofrecía la posibilidad de aumentar el potencial predictivo de estos anticuerpos estableciendo perfiles distintos dentro del grupo de pacientes ACPA⁺. Sin embargo, no se han podido realizar subgrupos de pacientes en función del reconocimiento de distintos epítomos citrulinados y se ha comprobado que aquellos con un amplio repertorio de especificidades finas no presentan diferencias en sus características basales ni en la progresión de la enfermedad respecto a los pacientes que solo reconocen un número reducido de péptidos (Willemze et al. 2012).

A pesar de todos estos datos, los parámetros clínicos y de laboratorio de los que disponemos hasta el momento (incluyendo FR⁺, ACPA⁺, presencia del epítomo compartido y duración de

los síntomas) contribuyen a la explicación de **solo un 32%** de la **variación de la progresión** del daño estructural y de la progresión de la enfermedad (de Rooy et al. 2011).

Respecto a la **actividad de la enfermedad**, la **PCR**, la **VSG**, proteínas del **complemento** como C3 y C4 y **anticuerpos anti-DNA** son parámetros clínicos clásicamente asociados a ésta (Robinson y Mao 2016). Estos parámetros, si bien son informativos, carecen de capacidad predictiva suficiente.

En los últimos años se ha desarrollado un nuevo sistema de predicción de la actividad de la enfermedad en la AR combinando **12 biomarcadores serológicos** de forma simultánea (Eastman et al. 2012, Centola et al. 2013). Los denominados **MBDA** (*multi-biomarker disease activity*) incluyen, entre otros, reactantes de fase aguda como la **PCR** y el **SAA** (amiloide sérico A); moléculas de adhesión como **VCAM-1**; metaproteinasas como **MMP1** y **MMP3**; factores de crecimiento como **EGF** y **VEGF**; hormonas como la **leptina** y la **resistina**, y citocinas como la **IL-6**. El algoritmo final del MBDA genera una escala de puntuación de 1 a 100 que **refleja** de forma consistente la **actividad clínica de la enfermedad** en un momento concreto y, además, puede rastrear los cambios producidos con el tiempo (Hirata et al. 2013). Más aún, dicha puntuación parece **predecir la progresión del daño radiológico** tanto basalmente como a lo largo del curso de la enfermedad (Markusse et al. 2014). En un estudio reciente se ha valorado el efecto de la utilización del test MBDA en la **calidad de vida** de los pacientes, así como en el **coste** que supone su cuidado. Los resultados ponen de manifiesto que el uso de este sistema de evaluación de la actividad conduce a modificaciones en las pautas de tratamiento que mejoran el estado funcional de los pacientes y ahorran costes (Michaud et al. 2015).

En el campo de los biomarcadores genéticos, datos recientes sugieren que la presencia en homocigosis del alelo T en el rs7574865 del gen de STAT4 en pacientes con AR temprana podría conducir al desarrollo de formas más severas de la enfermedad en términos de mayor actividad y discapacidad (Lamana et al. 2012).

En cuanto a posibles **marcadores derivados de hueso y cartílago**, si bien su capacidad diagnóstica es muy limitada, sí pueden resultar útiles en la monitorización de la enfermedad y predicción de su progresión. Además de la utilidad de MMP1 y MMP3, incluidas en el MBDA comentado anteriormente, diversos estudios en cohortes de AR tras largos periodos de seguimiento han propuesto que los niveles basales elevados de **CTX-I** y **CTX-II** (telopéptido-C del colágeno tipo I y tipo II) así como de la ratio **RANKL/OPG** son predictores independientes de la progresión del daño radiológico (Syversen et al. 2009, van Tuyl et al. 2010).

En un estudio prospectivo con 10 años de seguimiento en pacientes con AR han comprobado que la presencia de **anticuerpos anti-VCM** predice el daño articular y que la fuerza de esta predicción es al menos tan fuerte como la de los anti-CCP. Además de su mera presencia/ausencia, la titulación de estos anticuerpos añade información sobre el pronóstico (Syversen et al. 2010).

Finalmente, se han detectado niveles de **calreticulina** sérica elevados en pacientes con AR respecto a controles sanos, observándose además una correlación significativa con la actividad de la enfermedad (Ni et al. 2013). La calreticulina es una proteína multifuncional implicada en el almacenamiento de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico y que también se localiza en el núcleo, sugiriendo una posible implicación en la regulación de la transcripción génica. Así mismo, la **calprotectina**, una proteína heterodimérica compuesta por las subunidades S100A8 y S100A9, quelante de Mn^{2+} y Zn^{2+} en presencia de calcio, se encuentra basalmente elevada en suero y líquido sinovial de pacientes con AR, sirviendo como marcador de futuro daño erosivo (Abildtrup et al. 2015).

4.3.3. BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LA AR

Existen biomarcadores que pueden **guiar las decisiones terapéuticas**, ya sea monitorizando la respuesta de un paciente a un fármaco, o bien mediante la identificación de aquellos individuos que tienen mayor probabilidad de responder a un determinado tratamiento. De esta forma, el uso de dichos biomarcadores no solo permite optimizar las **terapias personalizadas** sino también **reducir el coste** del desarrollo y empleo de fármacos (Robinson et al. 2013). Por ejemplo, el uso de terapias de bloqueo del TNF se ha extendido ampliamente desde hace varios años, a pesar de lo cual su coste sigue siendo exorbitado y, además, hasta un 25% de los pacientes fracasan ante este tratamiento. Se ha comprobado que factores como el sexo, la edad y la presencia de ACPA/FR influyen en la respuesta a anti-TNF, pero únicamente explican un 20% de la variabilidad en la respuesta a estos fármacos (Potter et al. 2009). Esto hace necesaria la identificación de nuevos biomarcadores de respuesta a estos agentes terapéuticos. Adicionalmente, la reciente irrupción de nuevas terapias con los ya mencionados *Jakinibs*, hace también necesaria la búsqueda de biomarcadores que ayuden a identificar a las subpoblaciones de pacientes que obtendrían mayor beneficio de este tratamiento en concreto (Choy et al. 2013).

En AR de reciente comienzo, el estatus positivo de los **ACPA** influye en la necesidad de **combinar FAMEs** y altas dosis de **corticoides** para prevenir la progresión radiológica. Además, parece que los corticoides solo proporcionan mejoras significativas en la enfermedad en los pacientes ACPA⁺ (Seegobin et al. 2014). Así mismo, en pacientes

refractarios a terapias anti-TNF, la presencia tanto de los ACPA como del FR predice una mejor respuesta al tratamiento con **Rituximab** (Sellam et al. 2011). Se ha observado también que el tratamiento con monoterapia de FAMES en pacientes ACPA⁺ no detiene la progresión radiológica; sin embargo, si este grupo de pacientes es tratado desde el inicio con una terapia combinada, no se observan diferencias en la destrucción articular entre pacientes ACPA⁺ o ACPA⁻ (de Vries-Bouwstra et al. 2008). Esto demuestra que un tratamiento eficaz es capaz de prevenir la progresión radiológica, incluso en pacientes con factores de riesgo de daño severo. Por otro lado, y sobre todo en etapas tempranas de la enfermedad, dentro de los pacientes **ACPA⁺**, aquellos que presentan títulos **bajos** o **intermedios** responden mejor al tratamiento con MTX que los que presentan niveles elevados (Visser et al. 2008). Todos estos datos apuntan a que la clasificación de los pacientes con AR en función de que sean ACPA⁺ o ACPA⁻ puede ayudar a optimizar las estrategias de tratamiento, sirviendo estos anticuerpos como biomarcador para guiar las decisiones terapéuticas.

El **FR** también es capaz de reflejar la respuesta a ciertas terapias biológicas tales como los inhibidores de TNF (Etanercept e Infliximab) o **FAMES** tradicionales como el MTX, comprobándose que la reducción en los niveles de FR (IgM) tras el tratamiento se produce paralelamente a una buena respuesta clínica (Bobbio-Pallavicini et al. 2007b). Además, niveles basales elevados de FR (IgA) parecen asociarse a tasas de respuesta más pobres al bloqueo de TNF (Bobbio-Pallavicini et al. 2007a).

Un biomarcador tisular validado en la AR es la molécula **CD68** expresada en la superficie de los macrófagos activados en la membrana sinovial. Su expresión muestra una clara asociación con la respuesta al tratamiento (van de Sande et al. 2011). En la misma línea, se ha descrito la **disminución del número de macrófagos** en el *sublining* de la membrana sinovial como un marcador temprano de eficacia terapéutica en la AR (Haringman et al. 2005).

Mediante estudios de GWAS y del enfoque del gen candidato, se han identificado diversos **polimorfismos** en genes como **MED15**, mediador en la señalización de TGF- β ; **MAFB** esencial para la diferenciación de monocitos y macrófagos; la **IL-10** o la proteína **PTPRC**, regulador de la señalización de células T y B y de receptores de citocinas, que presentan asociación con la respuesta a diversas terapias de bloqueo de TNF (Ferreiro-Iglesias et al. 2016, Julia et al. 2016).

4.3.4. OTROS BIOMARCADORES EMERGENTES

4.3.4.1. LA PLATAFORMA 14-3-3 η

Las **proteínas 14-3-3** pertenecen a una familia de chaperorinas constituida por 7 isoformas predominantemente intracelulares. En el suero y el líquido sinovial de pacientes con AR se han detectado niveles de la **isoforma 14-3-3 η** significativamente más elevados que en los controles (tanto en individuos sanos, como en pacientes con artropatías y con otras enfermedades autoinmunes) (Kilani et al. 2007).

Maksymowych y cols. llevaron a cabo el estudio de los niveles de 14-3-3 η en dos cohortes de pacientes, una de AR establecida y otra de reciente comienzo. En ambos casos comprobaron que los niveles de esta proteína eran significativamente más altos en pacientes con AR que en controles (tanto individuos sanos como pacientes con OA y otras dolencias inflamatorias), mostrando una capacidad de **discriminación** con **elevada sensibilidad y especificidad** (77% y 92,5% en AR establecida y 64% y 92,6% en AR de reciente comienzo) (Maksymowych et al. 2014a). Un hecho interesante respecto al potencial diagnóstico de esta proteína es que no todos los pacientes que presentan niveles elevados son seropositivos para los ACPA o el FR; así, comprobaron que la detección de 14-3-3 η puede **complementar a ambos marcadores** permitiendo incrementar el porcentaje de casos de AR identificados. Así, la combinación de ACPA y 14-3-3 η supone una tasa de identificación de pacientes con AR temprana de un 72% en comparación con el 59% de los ACPA en solitario.

Por otra parte, los niveles de 14-3-3 η son más altos en aquellos pacientes que presentan elevada la PCR y el DAS28, actuando como **indicador de la actividad** de la enfermedad (Maksymowych et al. 2014b).

En lo relativo a su posible **papel en la patogénesis** de la AR, estudios de estimulación celular *in vitro* muestran que 14-3-3 η actúa fundamentalmente sobre células del sistema inmune innato provocando la activación de cascadas como MAPK/ERK o JAK-STAT y la regulación positiva de la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF), así como de RANKL y MMP9 (Maksymowych et al. 2014b). Además, existe una potente **correlación** entre los niveles de esta proteína y los de **MMP1** y **MMP3** (Kilani et al. 2007). Todo ello señala la potencial contribución de 14-3-3 η a la perpetuación de la enfermedad y a su posible relación con el daño articular. En la misma línea, se ha observado que los niveles de 14-3-3 η son más altos en aquellos pacientes con AR temprana que sufren progresión radiológica (Boire G. 2014, van Schaardenburg D. 2014a) confiriéndole valor como **marcador de pronóstico**.

Adicionalmente a todos esos usos potenciales, varios estudios muestran que pacientes con **niveles basales bajos** de 14-3-3 η tienen mayor probabilidad de **buena respuesta a terapia** tanto con FAMES (van Schaardenburg D. 2014b), como con Tocilizumab (Sagawa A. 2014) y con inhibidores de TNF (Marotta A. 2014). Por tanto, dado que 14-3-3 η puede perpetuar la “tormenta de citocinas” en la AR, sus niveles circulantes pueden funcionar como **predictores de respuesta a tratamiento**.

Finalmente, tal como mencionábamos al principio de este apartado, las proteínas 14-3-3 son fundamentalmente intracelulares. Esto supone, que la isoforma 14-3-3 η al ser externalizada pueda ser identificada como extraña dando lugar a la aparición de **autoanticuerpos** dirigidos contra ella. Además, la 14-3-3 η extracelular puede ser reconocida por enzimas **PAD** que conduzcan a su **citrulinación** y, de nuevo, a la aparición de nuevos autoanticuerpos contra la 14-3-3 η -citrulinada (Maksymowych y Marotta 2014). Un estudio reciente ha demostrado que la presencia de autoanticuerpos **anti-14-3-3 η** , ya sea solos o en combinación con la proteína 14-3-3 η , el FR y/o los ACPA, son capaces de **identificar** a una gran mayoría de pacientes con AR temprana (Maksymowych et al. 2015).

Así, estos 4 tipos de proteínas (14-3-3 η , 14-3-3 η -citrulinada, anticuerpos anti-14-3-3 η y anticuerpos anti-14-3-3 η -citrulinada) conforman la llamada **plataforma 14-3-3 η** , cuyo potencial como biomarcadores en la AR está siendo actualmente explorado en mayor profundidad en diversos estudios multicéntricos independientes.

4.3.4.2. CXCL13

CXCL13 es una quimiocina esencial en la organización de los centros germinales y se ha observado que su expresión está aumentada en la sinovia inflamada, pudiendo participar en el proceso de **sinovitis** autoinmune. Además, podría también contribuir a la **erosión** ósea dado que los osteoblastos poseen el receptor de CXCL13 y su activación produce la liberación de enzimas que degradan la matriz extracelular (Lisignoli et al. 2003).

Se ha observado que los **niveles elevados** de CXCL13 séricos son indicadores de **enfermedad activa** y también **predictores de severidad**; más aún, la bajada que experimenta esta quimiocina tras la terapia de bloqueo de TNF se correlaciona positivamente con cambios en el DAS28 pudiendo actuar también como marcador **farmacodinámico** (Rioja et al. 2008).

4.3.4.3. *microRNAs*

Estudios recientes muestran que, en el tejido sinovial de pacientes con AR, los FLS y los PBMCs sufren una desregulación de ciertos **microRNAs** implicados en funciones de control de la inflamación y la inmunidad, despertando el interés por su potencial como biomarcadores en esta enfermedad.

Se ha observado una **disminución** en la expresión de **miR-146a** en pacientes con AR, particularmente en aquellos con una **enfermedad activa** y en correlación con la inflamación de las articulaciones y con la **alteración** del fenotipo de las células **Treg** (Zhou et al. 2015a). Además, la ausencia de este microRNA provoca la desregulación génica y el aumento de **proliferación** de los **FLS**, tanto *in vivo* como *in vitro*, y potencia su capacidad para promover la generación de **osteoclastos** a través del control de la ratio RANKL/OPG (Saferding et al. 2017). Por tanto, los niveles de miR-146a pueden ser un marcador de **daño tisular** en las articulaciones sinoviales. Por otro lado, un estudio de búsqueda de biomarcadores de **predicción de respuesta a terapia** combinada anti-TNF/FAMEs demostró que varios microRNA, entre ellos el miR-146a, son significativamente *up*-regulados por la terapia y que su incremento de expresión, que únicamente se produce en pacientes respondedores, es paralelo a la bajada de niveles de TNF, IL-6, IL-17, FR y PCR (Castro-Villegas et al. 2015). Así, este microRNA serviría como un biomarcador para predecir y **monitorizar** la **respuesta al tratamiento**. Resultados alternativos indican que este microRNA está sobreexpresado en los PBMCs de pacientes con AR pero que es incapaz de funcionar adecuadamente dado que no regula la expresión de genes diana como TRAF6 o IRAK-1 (Pauley et al. 2008); así, describen una correlación positiva entre los niveles elevados de miR-146a y una alta actividad de la enfermedad basada en los niveles de PCR y VSG.

En cuanto al **miR-155**, se ha descrito un incremento en su expresión en macrófagos sinoviales y líquido sinovial de pacientes con AR asociado a un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias (Kurowska-Stolarska et al. 2011). En ese mismo estudio observaron que el modelo de ratón *knockout* para este miRNA es resistente al desarrollo de artritis inducida por colágeno con supresión de la respuesta Th17, autoanticuerpos e inflamación articular. Por otro lado se han hallado correlaciones entre la **actividad de la enfermedad** y los niveles de miR-155, destacando que puede contribuir a la patogénesis RA mediante la regulación de la producción de quimiocinas y la expresión de los receptores de quimiocinas proinflamatorias, promoviendo así el reclutamiento y retención de células inflamatorias en la sinovia (Elmesmari et al. 2016).

Finalmente, otro ejemplo de microRNA con potencial de biomarcador es el del **miR-125b**, cuyos niveles séricos están elevados en pacientes con AR respecto a controles. Cuando esos

niveles altos se encuentran en el momento del brote de la enfermedad se observa una clara asociación con **buena respuesta clínica** al tratamiento con Rituximab (Duroux-Richard et al. 2014).

En la [figura 19](#) se recogen los biomarcadores disponibles actualmente en AR.

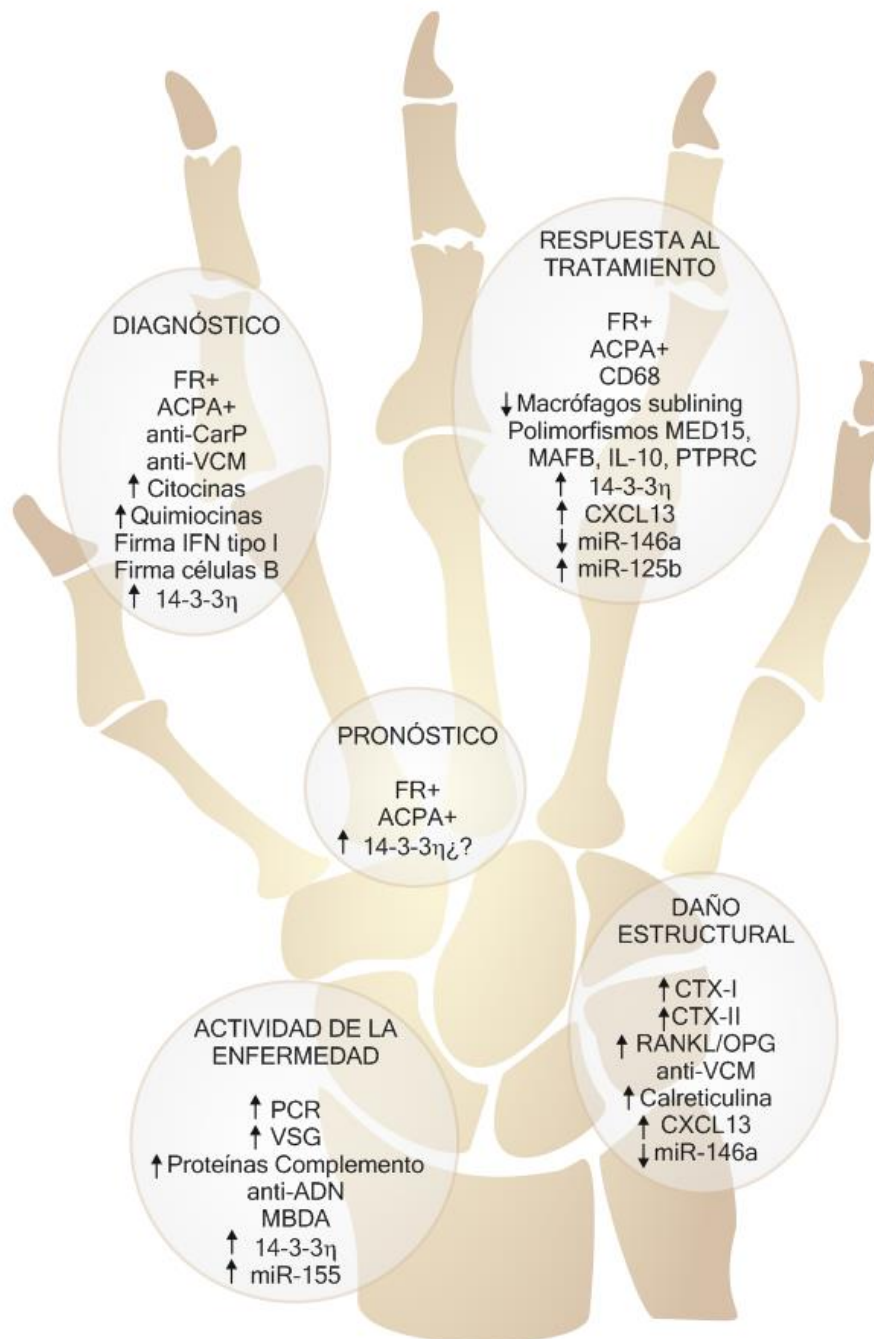


Figura 19. Panorama actual de los biomarcadores disponibles en AR.

4.4. BIOMARCADORES EN LA ESPONDILOARTRITIS

Identificar y **validar** biomarcadores solubles en la EspA continúa siendo un **reto** en el manejo de esta enfermedad. La necesidad de encontrar biomarcadores se sustenta en la importancia del **diagnóstico precoz**; en poder realizar la **evaluación de la actividad** de la enfermedad más allá de índices de medida basados en la percepción del paciente; en ser capaces de **identificar** a los **individuos** con elevado **riesgo** de mal pronóstico y, por último, en poder **valorar la respuesta al tratamiento** para implantar terapias más eficaces y personalizadas (Dougados y Baeten 2011, Maksymowych 2015).

En los últimos años se han identificado varios biomarcadores prometedores en el campo del diagnóstico precoz, la predicción de la progresión radiológica y la capacidad de respuesta al tratamiento. Si bien los estudios son preliminares, precisando validación en cohortes prospectivas y ensayos clínicos, analizaremos más detenidamente algunos de estos biomarcadores potenciales, sumados a los que están actualmente validados.

4.4.1. BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO EN LA EspA

Tal como se deducía de los estudios de asociación genética, la positividad para el **HLA-B27** es el biomarcador principal utilizado en el diagnóstico de la EspA, con una sensibilidad del 60-95% y una especificidad del 80-90%. La positividad para HLA-B27 en pacientes con EspA se asocia con edad más temprana al comienzo de la enfermedad, desarrollo de uveítis e historia familiar de EspA. Además, la combinación de **HLA-B27+** con **sacroileitis severa** en las IRM es un excelente predictor del desarrollo de EA (Bennett et al. 2008). Adicionalmente, se ha analizado el papel de HLA-B27 en el fenotipo de la EspA axial temprana, encontrando que su positividad se asocia a un inicio más temprano del dolor de espalda inflamatorio, menor retraso en el diagnóstico, mayor frecuencia de inflamación axial (tanto espinal como sacroilíaca) y daño radiográfico (Chung et al. 2011).

Recientemente se ha demostrado la capacidad diagnóstica de los **anticuerpos anti-CD74** dirigidos contra el péptido de la cadena invariante asociada a HLA-II (**CLIP**) en pacientes con EspA axial (Baraliakos et al. 2014a). La sensibilidad de estos anticuerpos es de un 97% en pacientes con EspA de reciente comienzo (duración de los síntomas inferior a 1 año) decayendo con el tiempo hasta situarse en un 67% en la población general de EspA. Además de en la forma axial de la enfermedad, este marcador también está presente en pacientes con APs sin afectación espinal (Baerlecken et al. 2014).

Actualmente se han propuesto los neo-epítomos generados en el metabolismo del **colágeno tipo I** (C1M) y **tipo III** (C3M) como biomarcadores diagnóstico dada su capacidad para discriminar entre individuos sanos y enfermos, tanto en EspA axial como en APs (Gudmann et al. 2017).

En otro estudio reciente de Turina y cols., se ha evaluado el posible valor diagnóstico de **los biomarcadores inflamatorios séricos** en la discriminación de la EspA axial de reciente comienzo frente a otras patologías caracterizadas por dolor de espalda temprano. El estudio, que incluía los marcadores PCR, VSG, calprotectina, IL-27, β -defensina humana 2 y lipocalina 2, demostró que ninguno de ellos sirve en el diagnóstico de la fase temprana de EspA axial. Los niveles de calprotectina se encontraban ligeramente elevados pero sin suficiente especificidad ni sensibilidad para otorgarle valor diagnóstico (Turina et al. 2017).

Por último, se ha observado que en EspA axial, con independencia de que existan anomalías en las IRM, la subpoblación de células **TCD4⁺ productoras de IL-17** está muy incrementada ya en las etapas más tempranas de la enfermedad, si bien su potencial como marcador de diagnóstico aún está por dilucidar (Jansen et al. 2015).

4.4.2. BIOMARCADORES DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD EN LA EspA

La **proteína C reactiva**, como reactante de fase aguda que es, sirve de fiel reflejo de la inflamación. Si bien su potencial como biomarcador diagnóstico quedó descartado por su baja sensibilidad y especificidad (Dougados et al. 1999), actualmente es el **principal marcador de actividad** de la enfermedad en la EspA. En pacientes con EA, la PCR mostró correlaciones significativas con parámetros clínicos como el dolor y la rigidez, así como con los índices BASDAI y BASFI, observándose además que la PCR de alta sensibilidad (hs-CRP, *high sensitivity C reactive protein*) es mejor marcador que la PCR convencional (Poddubnyy et al. 2010).

Del mismo modo que hemos comentado la posible utilidad diagnóstica del **C1M** y **C3M**, en ese estudio se ha comprobado también que la tasa de recambio de ambos colágenos en el tejido conectivo blando se incrementa en la EspA axial y la APs, asociándose sus niveles con la actividad de la enfermedad medida por el índice ASDAS (Gudmann et al. 2017).

La dificultad en la validación de nuevos biomarcadores de actividad de la enfermedad reside en la falta de un *gold standard* apropiado, ya que los índices de actividad y parámetros clínicos empleados no reflejan la histopatología que existe en las zonas de inflamación. Sin embargo, los **hallazgos basales en las IRM** sí correlacionan con las características histológicas de la inflamación (Bennett et al. 2008) y con la neoformación de hueso

(Baraliakos et al. 2008). De acuerdo con esto, las IRM podrían considerarse como el criterio principal de valoración de la actividad de la enfermedad y, en consecuencia, la validación de los biomarcadores debería hacerse con esta referencia (Maksymowych 2015). Así, la PCR es de nuevo un buen ejemplo de marcador de actividad puesto que correlaciona con la presencia de inflamación en las IRM (Machado et al. 2012).

4.4.3. BIOMARCADORES DE DAÑO ESTRUCTURAL EN LA EspA

El daño radiológico en la EspA, tal como hemos visto anteriormente, es resultado de la destrucción y de la neoformación ósea, siendo considerado un *outcome* muy importante en la enfermedad. Actualmente, el índice mSASSS es el *gold standard* para evaluar el daño estructural. Dado que la progresión radiológica ocurre muy lentamente, necesitándose intervalos hasta de varios años para apreciar cambios, la identificación de biomarcadores predictores del daño estructural es muy atractiva por su disponibilidad desde etapas tempranas de la enfermedad.

En un estudio retrospectivo en pacientes con EA, parámetros clínicos basales como la positividad de HLA-B27 y los niveles de PCR no son capaces de predecir la progresión radiológica; sin embargo, la **presencia basal de sindesmofitos** sí tiene una capacidad predictiva significativa (Baraliakos et al. 2009). En esta misma línea, en una cohorte prospectiva de 12 años de evolución, se corroboró que el factor predominantemente asociado a la progresión radiológica espinal es la presencia basal de hueso nuevo (Ramiro et al. 2015b).

A pesar de que hemos comentado que en estudios retrospectivos la PCR no parecía tener poder predictivo sobre el daño estructural, estudios prospectivos han demostrado lo contrario. **Niveles elevados de PCR** junto con el **tabaco** y la presencia basal de **sindesmofitos** se asocian, independientemente, con la progresión radiológica espinal en pacientes con EspA axial temprana (Poddubnyy et al. 2012). Estos resultados se han confirmado en un estudio posterior en el cuál, además de validar la asociación independiente de la PCR con la progresión radiológica, se ha observado que existe conexión entre la actividad de la enfermedad y el desarrollo del daño estructural espinal en EA, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad (Ramiro et al. 2014).

La búsqueda de biomarcadores de progresión radiológica se ha realizado también entre proteínas implicadas en las **vías del metabolismo óseo**. Así, por un lado, se ha identificado que sendos polimorfismos en **RANK** y **PTGS1** se asocian con progresión radiológica en EA (Cortes et al. 2015). Por otra parte, los niveles de **MMP3**, una metaloproteinasas involucrada en la degradación de la matriz extracelular durante los procesos de remodelación del hueso,

se encuentran elevados en pacientes de EA respecto a controles, siendo un indicador de riesgo frente a la enfermedad (Gao et al. 2015). Esta enzima parece útil en la predicción de la progresión radiológica en EA, especialmente en pacientes con daño estructural pre-existente (Maksymowych et al. 2007). El telopéptido-C del colágeno tipo II (**CTX-II**), indicador de la tasa de recambio del cartílago, se encuentra elevado en la orina de pacientes de EA respecto a individuos sanos. Además, los niveles de este péptido muestran correlación con la presencia de inflamación basal en las IRM en EspA axial, asociándose con la progresión del daño estructural (Maksymowych et al. 2008, Vosse et al. 2008, Pedersen et al. 2011b). El colágeno tipo II, principal proteína estructural del cartílago, y el tipo III, componente de la mayoría de tejidos conectivos, al ser escindidos por las metaloproteinasas generan los neo-epítomos **C2M** y **C3M** respectivamente. Se ha observado que los niveles C2M y C3M están elevados en pacientes con EA; asimismo, C3M correlaciona con el índice mSASSS y niveles séricos elevados de ambos marcadores en combinación son capaces de identificar a un 80% de pacientes que sufrirán progresión radiológica (Bay-Jensen et al. 2013b). En cuanto a la proteína **DKK-1**, inhibidora de la señalización de la vía canónica de Wnt implicada en la formación de hueso, aunque los niveles totales no presentan variación, su potencial como biomarcador de daño estructural se fundamenta en la observación de niveles funcionales más elevados en pacientes de EA carentes de sindesmofitos basales. Esto sugiere que niveles séricos elevados de DKK-1 funcional tienen papel protector frente al daño estructural; más aún, pacientes con tratamiento anti-TNF experimentan un incremento en los niveles de esta proteína (Daoussis et al. 2010, Heiland et al. 2012). En la misma línea que DKK-1 encontramos que la **esclerostina**, otro inhibidor de Wnt, se encuentra en niveles bajos en pacientes con EA en comparación con controles sanos. Estos niveles bajos de esclerostina se asocian significativamente con la formación de nuevos sindesmofitos (Appel et al. 2009). Dentro de los marcadores de metabolismo óseo se ha observado también que los niveles séricos de **Wnt-3a**, uno de los factores activadores de la vía canónica de Wnt, están elevados en EA y asociados con un aumento del mSASSS, señalándolo como un posible biomarcador del proceso osteoproliferativo (Klingberg et al. 2014).

Otros estudios recientes apuntan hacia el **VEGF**, promotor de la angiogénesis. Los niveles séricos de VEGF se encuentran elevados en la EspA y se asocian a actividad de la enfermedad y a niveles de PCR (Pedersen et al. 2011a). Pero los resultados más interesantes son los que respaldan su papel como predictor de progresión radiológica. El nivel sérico elevado de VEGF es altamente específico como predictor del daño espinal en pacientes con EspA axial, especialmente en aquellos con un alto riesgo de progresión debido a la presencia basal de sindesmofitos y de niveles elevados de PCR (Poddubnyy et al. 2014a).

La **calprotectina**, descrita previamente como marcador en AR, se encuentra notablemente elevada en el suero de pacientes con EspA axial. Niveles basales elevados de esta proteína correlacionan con el grado de progresión radiológica espinal en términos de mayor mSASSS, sirviendo como biomarcador predictivo de dicha progresión (Turina et al. 2014a).

Para finalizar, son también muy destacables los resultados obtenidos con **VICM**, un neo-epítipo procedente de la citrulinación de fragmentos de **vimentina** degradada por metaloproteinasas. Pacientes con EA presentan niveles basales de VICM más elevados que los controles sanos y, además, dichos niveles correlacionan con la PCR, el BASDAI y el daño radiológico espinal. Al mismo tiempo, pacientes que combinan niveles elevados de VICM y del índice mSASSS sufren un riesgo mucho mayor de progresión radiológica, produciéndose ésta en un 67% de los casos (Bay-Jensen et al. 2013a).

4.4.4. BIOMARCADORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LA EspA

Niveles **basales elevados de PCR** predicen la respuesta al tratamiento de bloqueo de TNF con independencia de otros parámetros como la duración de la enfermedad o la capacidad funcional basal, pudiendo facilitar la selección de pacientes que obtendrán un mayor beneficio de esta terapia (de Vries et al. 2009, Rudwaleit et al. 2009a).

La **calprotectina** basal, además de su papel como marcador de progresión radiológica, parece actuar también como predictor de respuesta de alta sensibilidad al cambio tras un tratamiento eficaz con inhibidores de TNF en ensayos de prueba de concepto (**PoC**, *proof-of-concept*). En este mismo estudio, se corrobora la capacidad de la **PCR** como marcador de respuesta a tratamiento, concretamente en su forma de **alta sensibilidad**, mientras que otros biomarcadores, tales como la MMP3 o el VEGF, no parecen responder a la terapia (Turina et al. 2014b). Otro ensayo de tipo PoC realizado con secukinumab, el inhibidor de la IL-17A, muestra que los niveles basales de calprotectina predicen la respuesta a la terapia y que el cambio de nivel producido tras 6 semanas de tratamiento correlaciona con la respuesta clínica en ese mismo periodo temporal (Baeten et al. 2013). En este último ensayo, además, se observó una buena respuesta clínica asociada de forma significativa a la presencia de un polimorfismo en **ERAP1**.

Otro marcador de respuesta al tratamiento de bloqueo del TNF es la **esclerostina**. Tras 12 meses de terapia se observa un incremento progresivo en sus niveles séricos, si bien, continúan siendo más bajos que en la población sana. Adicionalmente, pacientes que presentan simultáneamente niveles basales bajos de esclerostina y altos de PCR presentan mayor riesgo de continuar con niveles de PCR elevados tras 1 año de terapia. Estos datos

apuntan hacia los niveles basales de esta proteína como buenos predictores de la respuesta a tratamiento (Saad et al. 2012).

Finalmente, los niveles de **CTX-II** en la orina de pacientes con EA también responden ante el tratamiento de bloqueo de TNF provocando una reducción significativa de dichos niveles que, a su vez, se correlaciona con la disminución de la actividad de la enfermedad (Maksymowych et al. 2008).

En la [figura 20](#) se muestran los biomarcadores disponibles actualmente en EspA.

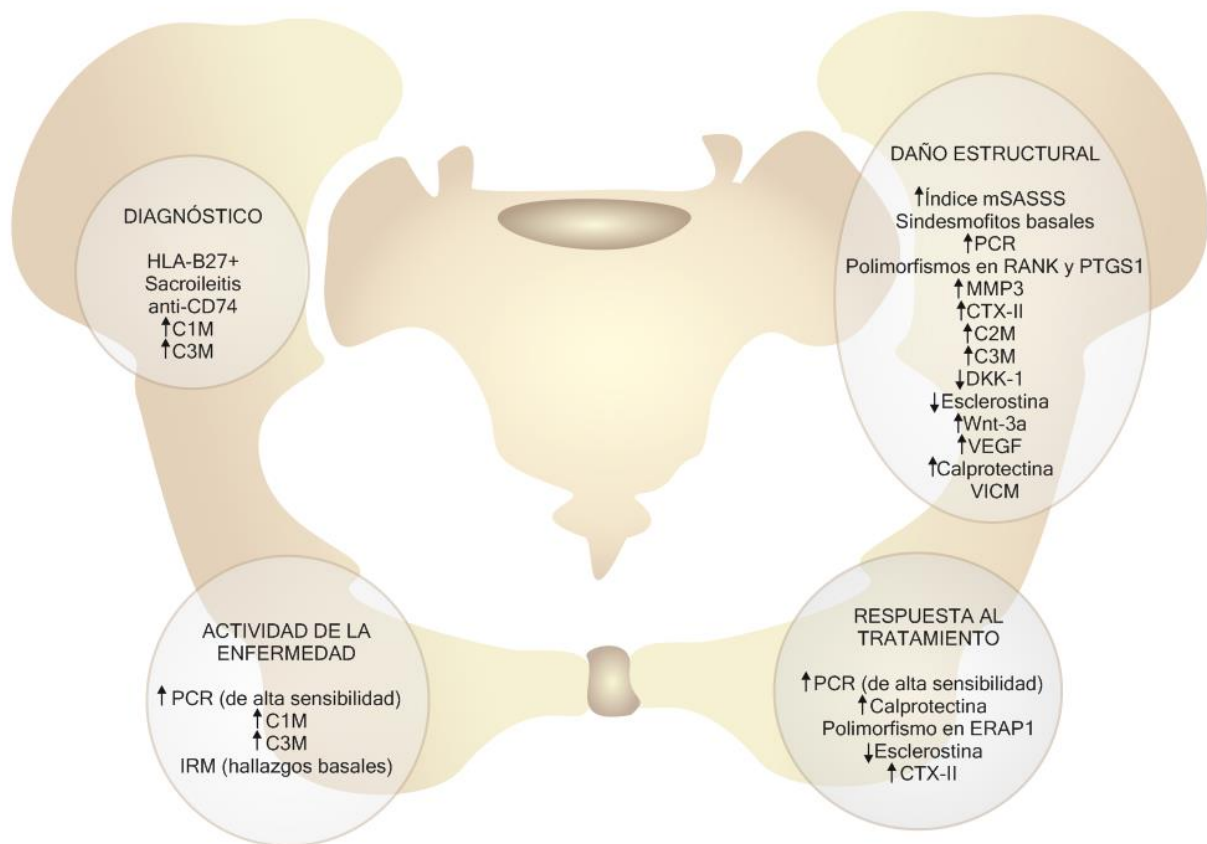


Figura 20. Panorama actual de los biomarcadores disponibles en EspA.

5. EL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO

5.1. LA NEUROINMUNOMODULACIÓN

En su evolución, los organismos vivos han incrementado progresivamente su complejidad funcional haciéndose necesaria la interacción entre los distintos sistemas fisiológicos para poder coordinar sus funciones biológicas. Así, los sistemas **nervioso, endocrino e inmune** lejos de actuar de forma independiente se **coordinan** para mantener la **homeostasis** del organismo, **comunicándose bidireccionalmente** a través de mediadores y receptores compartidos (Weigent et al. 1990, Goetzl y Sreedharan 1992). Este complejo circuito fue lo que a finales del siglo XX N. H. Spector dio en llamar **Neuroinmunomodulación (NIM)**, si bien la esencia detrás de este concepto se remontaba a relatos de viejas civilizaciones del Antiguo Egipto, China, Grecia e India donde ingeniosos pensadores y filósofos consideraban que la mente estaba involucrada en la defensa contra las enfermedades (Jankovic 1987, Spector 1987).

Uno de los ejemplos mejor conocidos de esta comunicación neuroinmune lo hallamos en el modo en que los estímulos estresantes inducen la activación del **eje hipotálamo-hipófisis-adrenal** produciéndose la secreción de glucocorticoides que inducen a la inmunosupresión y con ello a una mayor susceptibilidad frente a infecciones (Black 2002, Webster et al. 2002).

Hubo un tiempo en que el **cerebro** (SNC, sistema nervioso central) se consideraba un órgano **inmunoprivilegiado**, libre de daño e inflamación. A esta concepción contribuían la existencia de la barrera hematoencefálica, la baja expresión de moléculas HLA y la presencia predominante de macrófagos M2 (reparadores), CD tolerogénicas, IL-10 y TGFβ. Sin embargo, el concepto de la NIM, el descubrimiento de conexiones entre genes relacionados con el sistema inmune y las enfermedades neurológicas/neurodegenerativas y las evidencias de que la **neuroinflamación**, detrás de esas patologías, iba de la mano de marcadores de inflamación sistémica, abrió camino a un nuevo planteamiento. Al igual que en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, en el SNC el estrés induce la liberación de glucocorticoides y norepinefrina que conducen a la inmunosupresión; a su vez, en respuesta a estímulos inflamatorios, las terminaciones nerviosas de neuronas eferentes y sensoriales cercanas a las células inmunes liberan **neuropéptidos** con actividad inmunomoduladora (Weigent et al. 1990).

La NIM es una forma de comunicación que podemos encontrar a nivel local durante procesos patológicos tales como la **sinovitis** que se produce en las articulaciones afectadas

por AR. De hecho, en las células de la membrana sinovial existen receptores de glucocorticoides, andrógenos y estrógenos que indicarían la conexión entre el sistema endocrino y la inflamación articular (Cutolo et al. 2007). Además, la cronicidad de la sinovitis provoca la alteración del **sistema nervioso periférico** en el tejido sinovial inflamado perdiéndose la inervación simpática en favor de la profusión de fibras sensoriales que liberan una mayor cantidad de **neuropéptidos**, como la sustancia P, que contribuyen al proceso inflamatorio (Koopman et al. 2011, Straub et al. 2013).

Finalmente, hallazgos recientes apuntan hacia la contribución de los **exosomas** en este proceso de comunicación neuroinmune. Los exosomas son vesículas extracelulares (**VEs**) que contienen en su interior proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y que intervienen en la comunicación intercelular en procesos patológicos y en la modulación de las respuestas inmunes (Robbins y Morelli 2014). Al parecer, en respuesta a inflamación sistémica, los exosomas constituyen un sistema de comunicación de señales entre las células de sangre periférica y el cerebro a través de la transferencia de RNA funcional mediante exosomas secretados por las células sanguíneas (Ridder et al. 2014).

Dentro del conjunto de **neuropéptidos** producidos durante respuestas autoinmunes y procesos de inflamación sistémica y local, que actúan como **agentes inmunomoduladores** restableciendo la homeostasis del sistema inmune (Souza-Moreira et al. 2011) encontramos al péptido intestinal vasoactivo (VIP).

5.2. EL DESCUBRIMIENTO DE VIP: UN MEDIADOR NEUROINMUNE

Sami Said describió por primera vez a finales de los años 60 la existencia de un agente vasoactivo peptídico con capacidad vasodilatadora sistémica presente en el pulmón de mamíferos. En colaboración con Victor Mutt consiguió purificar dicho péptido a partir de pulmón porcino, pero solo parcialmente. La dificultad en el aislamiento a partir de pulmón les condujo hacia su búsqueda en el intestino, dado que ambos tejidos tienen un origen embrionario común. Así, utilizando tejido duodenal porcino, ambos lograron aislar un péptido vasodilatador al que denominarían **Péptido Intestinal Vasoactivo** (Said y Mutt 1970).

Unos años más tarde se demostró la presencia de este péptido en distintas zonas del **sistema nervioso central y periférico**, tales como los cuerpos, axones y dendritas neuronales (Said y Rosenberg 1976, Giachetti et al. 1977) así como en terminaciones presinápticas (Johansson y Lundberg 1981), otorgando al VIP la categoría de **neuropéptido**

con funciones **neuromoduladoras** y **neurotransmisoras**. Dicho papel se confirmó con la caracterización de receptores de VIP en numerosas zonas del SNC (Staun-Olsen et al. 1982).

Muy pronto se hallaron también receptores de VIP en diversos tipos celulares del **sistema inmune**, tales como linfocitos, líneas celulares linfoides tanto humanas como de rata, células mononucleares sanguíneas, etc. Así, el VIP empieza a ser considerado también como un péptido **modulador de la función inmune** dentro de un eje neuroinmunoendocrino (Fantini et al. 1985, Gomariz et al. 1990, Gomariz et al. 1994b).

Su presencia en el sistema nervioso da lugar a su liberación en **múltiples órganos** a través las fibras nerviosas que los inervan; entre dichos órganos encontramos: corazón, riñón, pulmón, glándula tiroidea, tracto gastrointestinal y urogenital, además de órganos del sistema inmune como el timo, el bazo o los ganglios linfáticos. Esta amplia distribución del VIP es claro reflejo de su **pleiotropismo funcional**, actuando como **neurotransmisor**, **inmunoregulador**, **vasodilatador** y estimulador de la secreción de hormonas o **secretagogo** (Delgado y Ganea 2011). Así, participa en una gran variedad de **actividades fisiológicas** relacionadas con el desarrollo, el crecimiento, la respuesta inmune, los ritmos circadianos, funciones de los sistemas digestivo, respiratorio, cardiovascular y reproductor, control endocrino, etc. (Couvineau y Laburthe 2012b). Algunas de las múltiples actividades biológicas de VIP incluyen el aumento del gasto cardíaco, la broncodilatación, la relajación del músculo liso, la regulación de los procesos de secreción y la motilidad en el tracto gastrointestinal. Además, como secretagogo, VIP promueve la liberación de prolactina, hormona luteinizante y hormona del crecimiento por parte de la glándula pituitaria y regula la liberación de insulina y glucagón en el páncreas. Este péptido también promueve la analgesia, la hipertermia, el aprendizaje y el comportamiento; tiene efectos neurotróficos y regula el metabolismo óseo y el desarrollo embrionario (Ganea et al. 2015) ([Tabla 5](#)).

Tabla 5. Actividades biológicas generales de VIP.

LOCALIZACIÓN	EFEECTO DE VIP	REFERENCIAS
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	Efectos generales	
	Analgesia	(Haghjoo et al. 1996)
	Hipertermia	(Said 1986)
	Acción hipnótica	(Riou et al. 1981)
	Desarrollo cerebral en la embriogénesis	(Moody et al. 2003)
	Efectos sobre el comportamiento	
	Modulación de la memoria y el proceso de aprendizaje	(Ivanova et al. 2012, Maduna y Lelievre 2016)
	Efectos sobre el hipotálamo	
	Mantenimiento de los ritmos circadianos	(Harmar 2003, Maduna y Lelievre 2016)
	Modulación de la liberación de neuropéptidos (prolactina, GABA,...)	(Vijayan et al. 1979, Reed et al. 2002)
	Regulación de la transmisión sináptica en el núcleo supraquiasmático	(Itri y Colwell 2003)
	Efecto anorexigénico	(Tachibana et al. 2004)
	Efectos Neurotróficos	
	Estimulación de la neurogénesis, la proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal	(Brenneman y Eiden 1986, Pincus et al. 1994)
	Estimulación del desarrollo de neuritas	(Pincus et al. 1990)
	Inhibición de la apoptosis neuronal	(Moody et al. 2003)
	Acción neuroprotectora:	(Delgado y Ganea 2003, Brenneman 2007, Delgado et al. 2008c, González-Rey y Delgado 2008, Passemard et al. 2011)
	En patologías inflamatorias	
	Inhibición de la activación de la microglia	
	Inhibición de la expresión de COX-2	
	Neuroprotección durante el desarrollo cerebral	
	Efectos sobre microglía y astrogía	
	Regulación de la proliferación, plasticidad, metabolismo y biosíntesis de factores neurotróficos y gliotransmisores en la astrogía	(Sorg y Magistretti 1992, Masmoudi-Kouki et al. 2007)
	Inhibición de la producción de mediadores inflamatorios en la microglía	(Delgado et al. 2008c)
SISTEMA ENDOCRINO	Efectos sobre la hipófisis	
	Estimulación de la producción de la hormona del crecimiento, la prolactina y la hormona luteinizante	(Vijayan et al. 1979)
	Estimulación de la producción de hormona adrenocorticotropa	(Oliva et al. 1982)
	Efectos sobre el tiroides	
	Estimulación de la secreción de hormonas tiroideas	(Ahren 1984)
	Efectos sobre la glándula suprarrenal	
	Estimulación de la producción de catecolaminas	(Malhotra et al. 1988)
	Efectos sobre el páncreas	
	Estimulación de la producción de insulina y glucagón	(Winzell y Ahren 2007)
	Reducción del estrés oxidativo en las células del acino pancreático	(Fujimori et al. 2011)
SISTEMA RESPIRATORIO	Broncodilatación	(Morice et al. 1983, Palmer et al. 1986)
	Modulación de la secreción de las glándulas mucosas	(Groneberg et al. 2001)
	Regulación del transporte de iones en el epitelio nasal y bronquial	(Rafferty et al. 2009, Qu et al. 2011)
	Estimulación de la proliferación de las células del epitelio bronquial	(Guan et al. 2009)
SISTEMA CARDIOVASCULAR	Efectos coronarios múltiples Efecto ionotrópico Vasodilatación Regulación del tono vasomotor Modulación del flujo sanguíneo coronario Regulación del latido cardíaco	(Henning y Sawmiller 2001)

APARATO REPRODUCTOR	Estimulación de la esteroidogénesis en ovario y testículo y de la producción de testosterona	(Ottesen y Fahrenkrug 1995)
	Modulación de la ovulación y estimulación de la erección del pene	(Ottesen y Fahrenkrug 1995)
	Estimulación de la diferenciación y proliferación de células epiteliales prostáticas	(Juarraz et al. 2001)
TRACTO GASTROINTESTINAL	Estimulación de la relajación de la musculatura lisa	(Said y Mutt 1970)
	Estimulación del intestino grueso y delgado	(Burleigh y Banks 2007)
	Disminución de la motilidad gástrica e intestinal	(Olsson y Holmgren 2001)
	Inducción de la gluconeogénesis intestinal a través de VPAC1 en los enterocitos	(De Vadder et al. 2015)
TEJIDO ÓSEO Y CARTÍLAGO	Disminución de la resorción ósea por los osteoclastos y estimulación del metabolismo de osteoblastos	(Lundberg et al. 1999, Lundberg et al. 2000)
	Regulación positiva de la condrogénesis y protección ante reacciones inflamatorias de tejidos circundantes	(Juhász et al. 2015)
MÉDULA ÓSEA	Inhibición de la proliferación de las células progenitoras	(Rameshwar et al. 2002)
PIEL	Estimulación de la proliferación de los queratinocitos	(Granoth et al. 2000)
TEJIDO ADIPOSO	Efecto lipolítico	(Akesson et al. 2005)
CÓRNEA	Protección frente a daño por estrés oxidativo y preservación de la córnea de donante humano para trasplante	(Koh y Waschek 2000, Koh 2012)
CÉLULAS TUMORALES	Estimulación del crecimiento en neuroblastoma y en tumores de pulmón y páncreas	(Pincus et al. 1990, Moody et al. 1993, Jiang et al. 1997)
	Inhibición del crecimiento en líneas de cáncer de colon	(Gamet et al. 1992)
	Inhibición de la apoptosis en la línea de cáncer prostático PC-3 e inducción de la diferenciación neuroendocrina en la línea LNCaP	(Gutiérrez-Cañas et al. 2003, Gutiérrez-Cañas et al. 2005)
	Regulación de la proliferación de células de cáncer gástrico	(Li et al. 2007)
	Disminución de la proliferación en carcinoma hepático	(Absood et al. 2008)
DESARROLLO EMBRIONARIO	Inducción de la transformación maligna en la línea RWPE-1 de cáncer prostático	(Fernandez-Martinez et al. 2010)
	Incremento de la capacidad fagocítica de las células trofoblásticas contribuyendo a la implantación del embrión en un ambiente tolerogénico y anti-inflamatorio	(Vota et al. 2017)
OTRAS ACCIONES	Contribución a la inducción de células Treg en la interfase materno-placentaria a través de un mecanismo operado por TGFβ1	(Fraccaroli et al. 2015)
	Péptido potencialmente antimicrobiano	(González-Rey et al. 2006a, Campos-Salinas et al. 2014)

5.3. ESTRUCTURA BIOQUÍMICA DE VIP Y SU FAMILIA

VIP pertenece a una amplia familia de neuropéptidos y hormonas, relacionados a nivel de secuencia y de estructura, denominada **familia secretina/VIP**. Además de VIP y secretina, esta familia cuenta entre sus miembros con el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (**PACAP**)²⁷ y **PACAP**³⁸, la **helodermina**, el péptido histidina-metionina (**PHM**, en humanos) o el péptido histidina-isoleucina (**PHI**, en otros mamíferos), el factor liberador de la hormona del crecimiento (**GHFR**), el **glucagón** y sus péptidos relacionados **GLP1** y **GLP2** y el péptido inhibidor gástrico (**GIP**) (Couvineau y Laburthe 2012b).

La **homología estructural** observada entre los distintos miembros de esta familia es muy elevada, siendo comunes las siguientes características (Dickson y Finlayson 2009):

- **Péptido precursor** formado por un péptido señal, de 1 a 3 péptidos bioactivos y péptidos N y C-terminales.
- Longitud del péptido maduro comprendida entre **25 y 50** residuos de aa.
- Síntesis y liberación por parte de células **nerviosas, inmunes y/o endocrinas**.
- Propensión marcada a la formación de estructuras en **α -hélice**.
- Presencia de un motivo estructural denominado **N-Cap** en la región amino terminal. Dicha estructura helicoidal, parece ser un elemento clave en la unión de estos péptidos a sus receptores y para la activación de los mismos, postulándose como una interesante diana terapéutica (Neumann et al. 2008).

Además de la ya comentada homología estructural (Fig. 21), los péptidos de esta familia muestran que la **homología en sus secuencias aminoacídicas** ha sido altamente conservada en la escala evolutiva, sugiriendo el origen común a partir de un gen ancestral (Sherwood et al. 2000).

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Longitud aa
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSTLN-----	28
PACAP27	HS DGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-----	27
PACAP38	HS DGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK-----	38
Helodermina	HS DAIFTEEYSKL LAK L A LQKYLA SILGSR TSP PP-----	35
PHM	HA DGVFTSDFS KLL GQL SAKKYLESLM-----	27
Secretina	HS DGTFTSELSRLREGARLQRLQGLV-----	27
GRF	YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL	44
Glucagón	HS QGTFTSDYSKY L DSRRA QDFVQWLMNT-----	29
GLP-1	HA EGTFTSDVSS YLEGQAA KE FIAWLVKGR-----	30
GLP-2	HA DGSFSD ENMT I LDNLAA R DFINWLIQT KITD-----	33
GIP	YA EGTFI SDYS IAMD KIHQ QDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ---	42

Figura 21. Comparación de secuencias aminoacídicas de VIP y otros péptidos de la familia VIP/Secretina.
En color azul se indica la homología en la secuencia y en color verde la identidad de la misma.

VIP es un péptido de 3.326 Da de peso molecular, con naturaleza **básica** y carácter **anfipático**. Su **estructura primaria** se compone de una única cadena con **28 aa** cuya secuencia está altamente conservada a lo largo de la evolución (Nicole et al. 2000b). Si bien la presencia de todos y cada uno de esos aa es necesaria para que VIP desempeñe todas sus funciones biológicas, se ha comprobado que determinados residuos son cruciales para dicho desempeño (His¹, Val⁵, Arg¹⁴, Lis¹⁵, Lis²¹, Leu²³ e Ile²⁶) (Nicole et al. 2000a). En cuanto a la **estructura secundaria**, presenta una bobina al azar en la región N-terminal y una estructura en α -hélice en la región C-terminal. Esta estructura es similar a la de otros miembros de la familia, especialmente a la de PACAP27 con quien comparte un 68% de homología de secuencia (Wray et al. 1993).

La **biosíntesis** de VIP comienza con una molécula precursora denominada **prepro-VIP** (170 aa). Dicho precursor será después metabolizado por proteasas del RE dando lugar al **pro-VIP** (148 aa) que será a continuación escindido por pro-hormonas convertasas originando **VIP-GRK** y **PHM-GRK** (Bloom et al. 1983). El metabolismo de ambos compuestos por parte de enzimas carboxipeptidasas-B genera **VIP-G** y **PHM-G** que tras la actuación de enzimas PAM (monooxigenasas amidantes de peptidil-glicina) generan finalmente **VIP** y **PHM** (Itoh et al. 1983).

5.4. LA GENÉTICA DE VIP

Localizado en la región q25.2 del **cromosoma 6**, el gen de VIP consta de **8.837 pares de bases** (pb) organizados en **6 intrones** y **7 exones** que codifican los distintos dominios funcionales (Bodner et al. 1985, Tsukada et al. 1985, Gozes et al. 1986) detallados en la [figura 22](#):

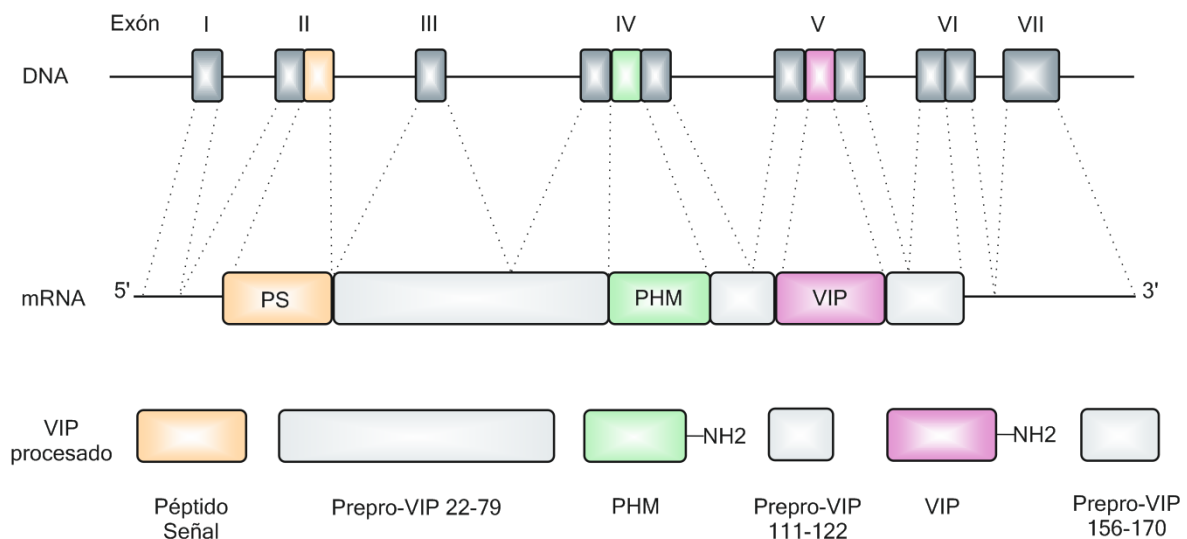


Figura 22. Estructura del gen de VIP. Transcripción, traducción y procesamiento.

- Exón 1 (165 pb): codifica la región 5' no traducida (5'UTR) del mRNA.
- Exón 2 (117 pb): codifica el péptido señal.
- Exón 3 (123 pb): codifica el extremo N-terminal del péptido.
- Exón 4 (105 pb): codifica el PHM.
- Exón 5 (132 pb): codifica el VIP.
- Exón 6 (89 pb): codifica el extremo C-terminal.
- Exón 7 (723 pb): codifica la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA.

El control de la **expresión génica** de VIP se realiza a través de un conjunto de **elementos reguladores** localizados en la región 5' altamente conservados en ratón, rata y humano (Fig. 23):

- En la **región A** se localiza un elemento regulador de la expresión específico de tejido (**TSE**). Con un tamaño de 425 pb y secuencias consenso octaméricas ATGCAAAT, es indispensable en la activación de la transcripción génica tras su unión a proteínas como **Oct-1** y **Oct-2**. En esta misma región, a ambos lados del TSE, se sitúan los elementos **AP-1/ets** y **VSE-1**, estimulador y silenciador de la transcripción respectivamente (Hahm y Eiden 1998b, Hahm y Eiden 1998a, Liu et al. 2001). Adicionalmente se encuentra el elemento restrictivo 1 (**RE-1**), que presenta interacción específica con el TSE (Hamelink et al. 2004).
- Elemento de respuesta a acetato de forbol miristato (**PMA**) con un tamaño de 7 pb y secuencia TGACTCA (Liu et al. 2001).
- En la **región B** se localizan las **cajas E** o hexámeros (CACCTG y CATGTG), mientras que las regiones consecutivas **C** y **D** contienen **elementos represores** (Hahm y Eiden 1998b, Hahm y Eiden 1998a). Situados en la región B se encuentran también los elementos reguladores reconocidos por proteínas **MEF-2** (*myocyte enhancer factor 2*) (Hahm y Eiden 1998a). Dentro de la región C se encuentra además un **elemento CyRE**, de 180 pb, implicado en la regulación de la expresión por citocinas y que presenta un sitio de unión a los factores de transcripción STAT y AP-1 (Sena et al. 1994, Symes et al. 1997).
- Elemento de respuesta a AMPc (**CRE**) de 17 pb y con dos dominios CGTCA invertidos (Tsukada et al. 1987).

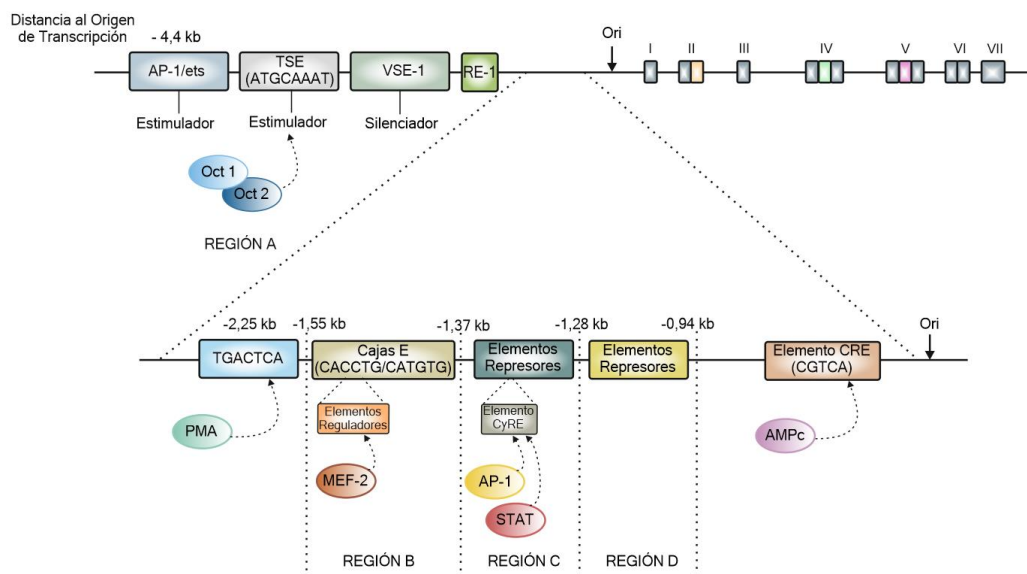


Figura 23. Regulación del gen de VIP: región Promotora (5').

En otro nivel de regulación de la expresión de VIP nos encontramos con los mecanismos de **modificación postranscripcionales**, esenciales en la estabilización del mRNA. Así, en la región 3'UTR se localizan tres motivos AUUUA, también conocidos como **secuencias desestabilizadoras**, que permiten la interacción con proteínas citoplásmicas formando complejos que desestabilizan el mensajero (Wolford y Signs 1995). Por último, se ha descrito que el mRNA de VIP puede presentar colas de adenina de distintos tamaños que afectan diferencialmente a la estabilidad del transcrito (Chew et al. 1994).

5.5. RECEPTORES DE VIP

5.5.1. ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE VIP

Tras el éxito del aislamiento de VIP por parte de Said y Mutt, comenzaron los estudios para la caracterización de sus receptores. Pronto se descubrió su presencia en una gran variedad de células y tejidos, tales como: células del hígado y adipocitos (Bataille et al. 1974), páncreas exocrino (Christophe et al. 1976), células cancerígenas humanas (Laburthe et al. 1978) y, por supuesto, epitelio intestinal (Prieto et al. 1979). Unos años más tarde, en 1989, el aislamiento de los péptidos PACAP27 y PACAP38 permitió observar la elevada homología estructural entre ambos sugiriendo que los receptores de VIP podrían igualmente unir PACAP (Miyata et al. 1989).

A partir de este momento, sucesivos estudios han demostrado que **VIP** y **PACAP** ejercen sus numerosas actividades biológicas a través de su unión a **tres receptores** denominados por la IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) como **VPAC1**, **VPAC2** y **PAC1** (Harmar et al. 2012). Se trata de receptores pertenecientes a la **familia B** (o clase II) de **receptores acoplados a proteínas G** (GPCRs) que, incluyen junto a los de VIP y de otros péptidos de su familia, receptores para la calcitonina, la hormona paratiroidea (PTH) y el factor liberador de corticotropina (CRF) (Laburthe et al. 2007).

Los receptores GPCR de clase II presentan las siguientes **características estructurales** comunes (Fig. 24) (Laburthe et al. 2007, Couvineau y Laburthe 2012a):

- Siete dominios transmembrana (**TM1-7**) conectados entre sí mediante tres bucles extracelulares (**EC1-3**) y tres intracelulares (**IC1-3**), encargados de la interacción con la proteína G.
- Un largo dominio **N-terminal extracelular** implicado en la **unión al ligando**. Dicho dominio a su vez se caracteriza por la presencia de:

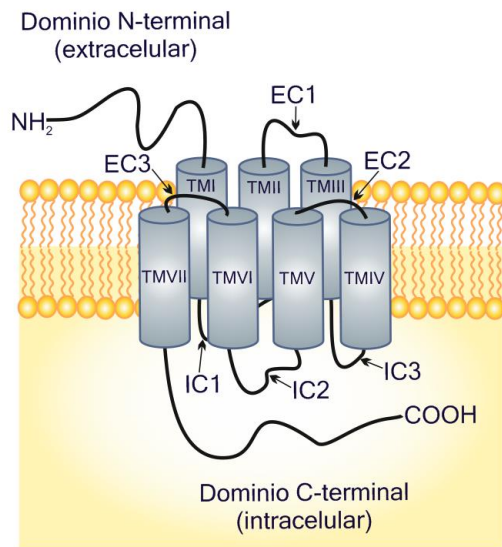


Figura 24. Estructura del receptor acoplado a proteína G (GPCR). EC: dominio extracelular; IC: dominio intracelular; TM: segmento transmembrana.

- Seis residuos de cisteína altamente conservados que contribuyen al mantenimiento de la conformación del receptor estableciendo puentes disulfuro.
- Un péptido señal hidrofóbico implicado en la inserción del receptor a la membrana plasmática.
- Varios sitios de glicosilación conservados implicados en el tráfico del receptor.
- Ausencia de motivos arquetípicos de los GPCRs de clase A.
- Compleja organización genética (presencia de varios intrones).

Clásicamente la localización celular de los GPCRs se circunscribía a la **membrana citoplásmica**, sin embargo, su presencia a nivel **intranuclear** ha sido ya constatada (Gobeil et al. 2006). Así, por ejemplo, se ha localizado el receptor VPAC1 en el núcleo de células humanas de cáncer de mama (Valdehita et al. 2010).

5.5.2. REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES DE VIP

Los receptores VPAC1 y VPAC2 pueden **homo/heterodimerizar** entre sí, así como con otros receptores de secretina (Harikumar et al. 2006), si bien la relación entre esa oligomerización y la funcionalidad biológica de los receptores continúa siendo conjetural. Por otra parte, VPAC1 tiene la capacidad de interactuar con proteínas modificadoras de la actividad del receptor o **RAMPs** (*receptor activity-modifying proteins*), particularmente con RAMP2. Dicha interacción, si bien no afecta a la afinidad por el ligando, desencadena una vía de señalización diferente a la principal de VPAC1 (Christopoulos et al. 2003, Wootten et al. 2013).

Entre los mecanismos de regulación de los receptores de VIP nos encontramos con la **desensibilización homóloga** por fosforilación a través de las **GRKs** (quinasas de los GPCRs) o la **desensibilización heteróloga** mediada por **PKC** (proteína cinasa C) o **PKA** (proteína cinasa A) y la **internalización** mediada por arrestinas (Shetzline et al. 2002, Mahavadi et al. 2013). La fosforilación del receptor provoca la unión de las **arrestinas** citosólicas que bloquean la capacidad del GPCR para interactuar con la proteína G conduciendo a su desensibilización y endocitosis mediada por clatrina (Moore et al. 2007).

Además, a **nivel transcripcional** se producen modificaciones mediadas por diversas moléculas como **hormonas** y **citocinas**. Tal es el caso de la regulación de VPAC1 por glucocorticoides y estradiol (Pei 1996, Madsen et al. 2001) o la de VPAC2 por IL-4 (Metwali et al. 2000). Así mismo se ha descrito la modulación de la expresión de VPAC1 por mecanismos mediados por microRNAs (Paladini et al. 2014).

Finalmente, algunos GPCRs como PAC1 pueden experimentar fenómenos de procesamiento postraducciona l o **splicing alternativo**. Así se hace posible la aparición de variantes que presenten modificaciones en el dominio N-terminal o los bucles extracelulares, alterando la capacidad de unión del ligando; así como de cambios en el dominio C-terminal y los bucles intracelulares, pudiendo afectar a la señalización del receptor (Harmar et al. 2012).

5.5.3. EL RECEPTOR VPAC1

El receptor para VIP y PACAP tipo I (**VPAC1**), también denominado **VIP1** o **VIPR1**, fue aislado por primera vez en 1992 a partir de tejido pulmonar de rata (Ishihara et al. 1992). En humanos el gen que codifica este receptor se encuentra en el **cromosoma 3** y presenta 16 exones que codifican una proteína de 457 aa cuya estructura tridimensional se caracteriza por el ectodominio N-terminal (**N-ted**), crucial para la unión del péptido agonista (Fig. 25) (Laburthe et al. 2007).

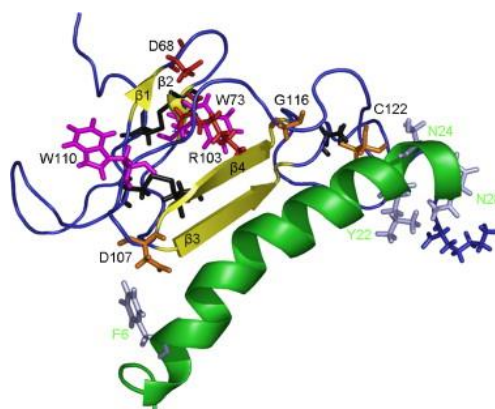


Figura 25. Modelo estructural de VPAC1 unido a VIP. En azul se muestra la cadena principal del receptor, en amarillo las láminas β , en negro los puentes disulfuro, en rosa los anillos aromáticos y en verde el péptido (Imagen de Laburthe *et al.*, 2007).

VPAC1 une con **afinidad similar VIP y PACAP** y, además, es capaz de reconocer a otros péptidos estructuralmente relacionados siendo el orden de afinidad, en células humanas, el siguiente (Dickson et al. 2006):

$$\text{VIP} = \text{PACAP27} = \text{PACAP38} = \text{PHM} > \text{Secretina}$$

Se han propuesto dos modelos diferentes para explicar la **activación** de VPAC1. Por un lado el modelo de “**los dos dominios**”, que postula que el agonista interacciona con dos regiones distintas del receptor: con el dominio N-ted y con un segundo dominio de unión, aún por caracterizar, que podría estar formado por los bucles extracelulares y la parte superior de algunas hélices transmembrana (Laburthe et al. 2002). Por otro lado, se ha propuesto que la activación de VPAC1 podría ocurrir como consecuencia de que la unión del ligando dejase al descubierto un “**epítipo oculto en el dominio N-ted**” y que dicho epítipo actuase como

el verdadero agonista que activa al receptor a través de la interacción con el núcleo heptahelical del mismo (Dong et al. 2006).

En lo relativo a su **distribución**, se encuentra ampliamente representado en el **SNC**, con elevada expresión en córtex cerebral e hipocampo (Ishihara et al. 1992, Usdin et al. 1994) e igualmente se ha descrito su presencia en **múltiples localizaciones periféricas** tales como corazón, pulmón, hígado, intestino grueso y delgado (Ishihara et al. 1992), tiroides (Toccafondi et al. 1984) linfocitos (Delgado et al. 1996a, Lara-Marquez et al. 2001), timocitos (Delgado et al. 1996b) y útero (Bajo et al. 2000), entre otros. Además, se ha constatado su expresión en macrófagos (Delgado y Ganea 2000, Gomariz et al. 2006), **sinoviocitos fibroblásticos** tanto en AR como en OA (Juarranz et al. 2008), osteoblastos y osteoclastos (Lundberg et al. 2000, Lerner y Persson 2008).

5.5.4. EL RECEPTOR VPAC2

El receptor para VIP y PACAP tipo II (**VPAC2**), también denominado **VIP2** o **VIPR2**, fue clonado en 1993 a partir de pituitaria de rata (Fig. 26) (Lutz et al. 1993). Este receptor está

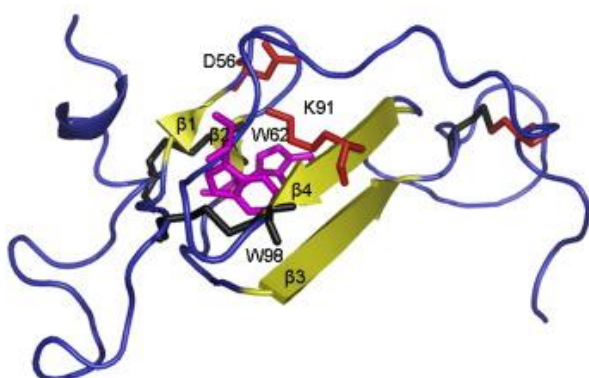


Figura 26. Modelo estructural de VPAC2. En azul se muestra la cadena principal del receptor, en amarillo las láminas β, en negro los puentes disulfuro y en rosa los anillos aromáticos (Imagen de Laburthe *et al.*, 2007).

codificado por un gen localizado en el **cromosoma 7** en el caso de los humanos y consta de 17 exones. Dada la similitud en cuanto a la organización genómica de los genes de VPAC1 y VPAC2 se ha propuesto la existencia de un gen ancestral común para ambos receptores (Laburthe et al. 2002).

Los estudios de mutagénesis dirigida contra el dominio **N-ter** demuestran su papel crucial en la unión al ligando (Nicole

et al. 1998), si bien parece que el reconocimiento del agonista por parte de VPAC2 está también determinado por un **gran dominio** en el núcleo del receptor constituido por el **TM5** y el bucle **EC3** (Juarranz et al. 1999).

La **afinidad** de VPAC2 por **VIP** es **ligeramente inferior** a la que presenta VPAC1, pero igual para VIP y para PACAP. Además une otros péptidos de la familia de VIP, con la excepción de la secretina por la que parece tener muy baja o nula afinidad. En células humanas el orden de afinidad de unión sería el siguiente (Dickson et al. 2006):

VIP = PACAP27 = PACAP28 = helodermina > PHM

Referente a su **localización**, la distribución de VPAC2 en el **SNC** es amplia, detectándose principalmente en núcleo supraquiasmático, tálamo, espina dorsal y ganglios raquídeos dorsales (Lutz et al. 1993, Sheward et al. 1995). La contribución más reciente e interesante sobre el papel de este receptor en el sistema nervioso apunta a que la duplicación del gen de este receptor confiere mayor riesgo de padecer esquizofrenia (Vacic et al. 2011). Igualmente se encuentra en diversos **tejidos periféricos** tales como: estómago, testículos, páncreas, bulbo olfatorio (Usdin et al. 1994), útero (Bajo et al. 2000) y pulmón (Busto et al. 1999), entre otros. En el caso del sistema inmune, la expresión de VPAC2 es inducible en linfocitos y macrófagos previa estimulación (Lara-Marquez et al. 2001, Gomariz et al. 2006) y se ha descrito su expresión en **sinoviocitos fibroblásticos** de AR y OA (Juarranz et al. 2008).

5.5.5. EL RECEPTOR PAC1

Finalmente, el receptor **PAC1** o **PACR1** de rata fue clonado en 1993 de forma prácticamente simultánea por distintos grupos de investigadores (Hashimoto et al. 1993, Hosoya et al. 1993, Pisegna y Wank 1993) y, ese mismo año, fue también clonado el transcrito humano (Ogi et al. 1993) (**Fig. 27**). El gen que codifica este receptor en humanos se localiza en el **cromosoma 7** y consta de 18 exones.

La **afinidad** de PAC1 por **PACAP27** y **PACAP38** es muy elevada; sin embargo, la capacidad de unión de VIP a este receptor es hasta 500 veces inferior en función de la localización. En general, en humanos, el orden de afinidad es el siguiente (Dickson et al. 2006):

$$\text{PACAP27} = \text{PACAP38} > \text{VIP}$$

Este receptor presenta una **expresión** en el **SNC** más abundante que VPAC1 y VPAC2, con localización preferente en zonas como el bulbo olfatorio, el giro dentado hipocampal, el núcleo supraóptico hipotalámico y el cerebelo (Basilie et al. 2000). Además está presente en numerosos **tejidos periféricos** tales como ovario, testículo, glándula adrenal, páncreas, pulmón, etc. (Hosoya et al. 1993, Ogi et al. 1993, Busto et al. 1999).

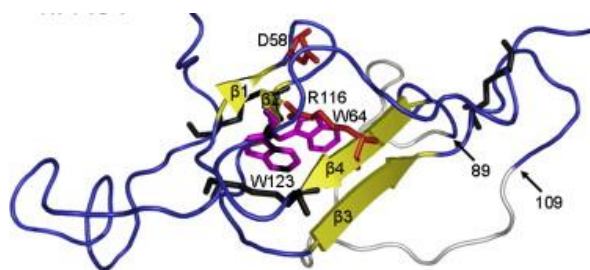


Figura 27. Modelo estructural de PAC1. En azul se muestra la cadena principal del receptor, en amarillo las láminas β , en negro los puentes disulfuro y en rosa los anillos aromáticos (Imagen de Laburthe *et al.*, 2007).

5.6. LA SEÑALIZACIÓN DE VIP

La vía de señalización de VIP se inicia con la unión de éste a sus receptores, VPAC1, VPAC2 y PAC1, que promueve un cambio conformacional conduciendo a la interacción del receptor con las proteínas G heterotriméricas. Dichas proteínas, formadas tres subunidades $\alpha/\beta/\gamma$, se clasifican en función del **tipo de subunidad α** que presentan, diferenciándose cuatro tipos principales:

- **G_s**: estimuladora, promueve el incremento de los niveles de AMPc.
- **G_{i/o}**: inhibidora, con efecto antagónico a G_s, induce la disminución del AMPc intracelular.
- **G_{q/11}**: modulación de la fosfolipasa C (PLC β).
- **G_{12/13}**: respuestas mediadas por Rho.

En estado basal el trímero $\alpha/\beta/\gamma$ está unido a **GDP** que tras la unión del ligando se intercambia por **GTP** convirtiéndose en la forma **activa** del receptor. Como resultado de la activación se produce la **hidrólisis del trímero** obteniéndose un dímero **G _{$\beta\gamma$}** y una unidad **G _{α}** -GTP, ambos con capacidad para accionar sus correspondientes efectores e iniciar las distintas vías de señalización. La finalización de la señal se produce tras la hidrólisis del GTP unido a G _{α} restituyéndose el complejo trimétrico inactivo (Johnston y Siderovski 2007, Hill et al. 2010, Langer 2012).

Los receptores de VIP se acoplan **preferentemente** a **G_{as}** conduciendo a la activación de la adenilato ciclasa (**AC**) con la consecuente producción de **AMPc**, cuya acumulación intracelular promueve la activación de la **PKA** dependiente de AMPc. La PKA puede activar la vía de señalización **MAPK-ERK** para estimular la proliferación (Le Pechon-Vallee et al. 2000) y diferenciación (Gutiérrez-Cañas et al. 2005) de células neuroendocrinas. Adicionalmente se ha comprobado que la activación de la PKA inducida por VIP es responsable de las **principales funciones antiinflamatorias** de este péptido a través de la regulación de distintas vías de señalización y factores de transcripción implicados en el incremento de los niveles de citocinas antiinflamatorias y la disminución de producción de las proinflamatorias (González-Rey et al. 2007b).

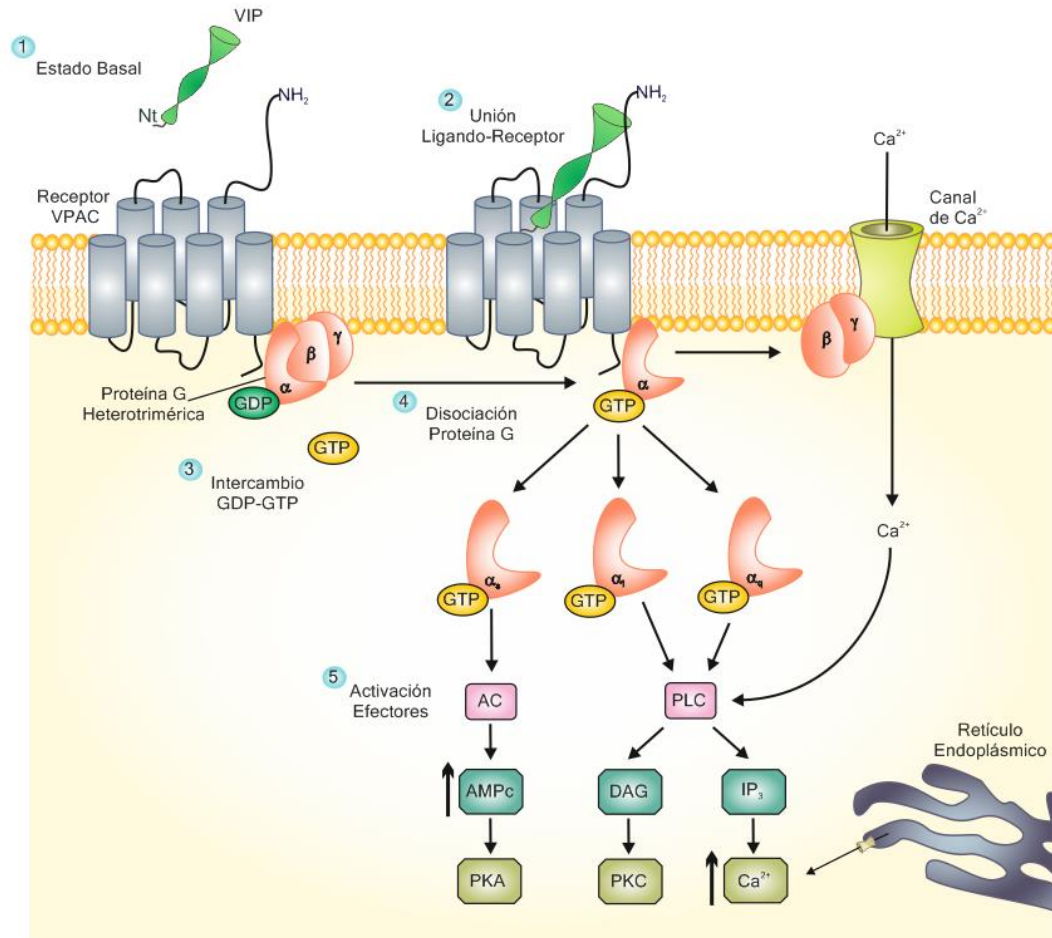


Figura 28. Principales vías de señalización desencadenadas por la unión de VIP a sus receptores.

Si bien el segundo mensajero por excelencia en la señalización de VIP es el AMPc, sus receptores tienen capacidad para acoplarse a otros subtipos de proteínas G desencadenando **vías de señalización alternativas** (Laburthe y Couvineau 2002, Dickson y Finlayson 2009). Mediante su unión a proteínas **G_q/G_i** inducen la activación de la fosfolipasa C (**PLC**) que hidroliza el fosfatidil inositol difosfato (**PIP₂**) produciendo inositol trifosfato (**IP₃**) y diacilglicerol (**DAG**). A su vez, el DAG inducirá la activación de otros efectores como la **PKC**, mientras que el **IP₃** promoverá la liberación de calcio (**Ca²⁺**) desde el interior de **RE** acumulándose en el citoplasma (Fig. 28). Además, el **dímero G_{βγ}** parece ser también responsable de la activación de la **PLC** a través de la activación de **canales de Ca²⁺** en la membrana plasmática. A pesar de que clásicamente se consideraba que el **Ca²⁺** era un segundo mensajero independiente al AMPc, se ha observado la elevación de sus niveles en respuesta a la activación de AMPc-PKA por parte de VIP (Hagen et al. 2006).

Vías de señalización adicionales activadas por la unión de VIP a VPAC1 y VPAC2, incluyen la modulación de la actividad de la fosfolipasa D (**PLD**) (McCulloch et al. 2000), la vía **JAK-**

STAT (Delgado y Ganea 2000), la señalización por **NF-κB** (Delgado y Ganea 1999), entre otras. Además, estudios recientes apuntan hacia la modulación que ejercerían VIP y PACAP sobre las vías de señalización implicadas en los procesos de condrogénesis y osteogénesis, principalmente la **vía Wnt/βcatenina**, Hedgehog y la BMP (Juhasz et al. 2015, Pérez-García et al. 2016).

5.7. VIP EN INFLAMACIÓN Y AUTOINMUNIDAD: AGENTE TERAPÉUTICO

El pleiotropismo funcional y la ubiquidad de VIP lo han convertido a lo largo de los años en **potencial agente terapéutico** para diversas enfermedades entre las que se han descrito: el asma (Groneberg et al. 2001), la hipertensión pulmonar (Petkov et al. 2003), la sarcoidosis (Prasse et al. 2010); enfermedades neurológicas como Alzheimer y Parkinson (Gozes et al. 1996, Korkmaz et al. 2010), infarto cerebral (Dogrukol-Ak et al. 2004); enfermedades inflamatorias intestinales como el Crohn (Abad et al. 2003, Abad et al. 2012), diabetes autoinmune (Jimeno et al. 2010), cáncer (Vacas et al. 2013) y disfunción eréctil (Dinsmore et al. 1999).

Algunos de los usos terapéuticos más prometedores de VIP se basan en sus potentes efectos antiinflamatorios y su capacidad inmunoreguladora.

5.7.1. PAPEL DE VIP EN EL SISTEMA INMUNE

Los órganos linfoides presentan dos fuentes distintas de VIP, las terminaciones nerviosas y las células del sistema inmune (Ganea et al. 2015). En este contexto, nuestro grupo describió en 1990, por primera vez, la presencia de VIP en células de apariencia linfocítica de timo y bazo y posteriormente utilizando diferentes técnicas, demostró su expresión en linfocitos de distintos órganos linfoides (Gomariz et al. 1992, Gomariz et al. 1993, Gomariz et al. 1994a, Leceta et al. 1994, Delgado et al. 1996c). Además de los linfocitos, otras células del sistema inmune como los mastocitos, los eosinófilos y los neutrófilos también producen VIP (Cutz et al. 1978, O'Dorisio et al. 1980, Aliakbari et al. 1987).

La síntesis y liberación de VIP por parte de los linfocitos es inducida por agentes que median importantes funciones inmunes como la activación antigénica, la inflamación y la apoptosis (Martínez et al. 1999). Se ha comprobado que los linfocitos Th2, y no así los Th1, secretan VIP tras su activación vía TCR (Martínez et al. 1999, Delgado y Ganea 2001).

Numerosos estudios, tanto en modelos animales como en humanos, demuestran que este péptido ejerce un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis inmune ya que modula, tanto de forma autocrina como paracrina, procesos de la inmunidad innata y adquirida

(Gomariz et al. 2001, Delgado et al. 2002b, Gomariz et al. 2006). Entre las funciones más relevantes destacan las siguientes: inhibe de la producción de citocinas y quimiocinas **proinflamatorias** como TNF, IL-6, IL-12, CXCL8 y CCL2, y **estimula** la expresión de citocinas **antiinflamatorias** como IL-10, así como induce la aparición de células dendríticas tolerogénicas (**CDt**) y de células **Treg**. Además, regula el **equilibrio Th1/Th2** durante la diferenciación de las células TCD4⁺ **en favor del perfil Th2** gracias a que inhibe la producción de IL-12, citocina esencial en la diferenciación Th1, promueve la supervivencia Th2 inhibiendo FasL y promueve la migración Th2 por gradiente quimiotáctico de CCL22. Así mismo, modula el **sistema Th17/Treg** y la polarización de las células Th hacia fenotipos Th17 no patogénicos (Delgado et al. 2004, Gomariz et al. 2006, Leceta et al. 2007, Jimeno et al. 2014, Ganea et al. 2015, Jimeno et al. 2015a, Jimeno et al. 2015c). Además, reduce la capacidad de activación de las células TCD4⁺ por parte de CD y macrófagos activados ya que **previene** la *up*-regulación de las **moléculas coestimuladoras** CD40, CD80 y CD86 (Delgado et al. 1999). Un estudio reciente de nuestro grupo muestra cómo la presencia de VIP durante la **diferenciación *in vitro* de macrófagos** hacia fenotipo inflamatorio los conduce hacia un **fenotipo menos patológico**, reduciendo su perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en favor de un perfil antiinflamatorio (Carrión et al. 2016).

Finalmente, VIP es capaz **de modular la señalización** mediada por los **TLRs**. Así, en un modelo de colitis experimental, VIP inhibe la expresión de TLR-2 y TLR-4 en macrófagos, CD y linfocitos (Gomariz et al. 2005). En la misma línea, VIP reduce la regulación al alza de la expresión de TLR-4 en sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con AR (Gutiérrez-Cañas et al. 2006).

El descubrimiento de la potente acción antiinflamatoria e inmunomoduladora de VIP abrió un abanico de posibilidades terapéuticas, conduciendo a la realización de numerosos trabajos en modelos animales *in vivo*. De ellos se desprende que la **administración de VIP** a corto plazo tiene un claro efecto **antiinflamatorio** en **modelos animales** de distintas enfermedades inflamatorias y autoinmunes tales como la **AR** (Delgado et al. 2001), la encefalomiелitis experimental autoinmune (**EEA**) (Li et al. 2006), la enfermedad de **Crohn** (Abad et al. 2003), el síndrome de **Sjögren** (Lodde et al. 2006), la esclerosis múltiple (**EM**) (Tan y Waschek 2011) y la **diabetes autoinmune** (Jimeno et al. 2010).

La importancia del VIP endógeno en la regulación de la inflamación y la autoinmunidad se ha confirmado en modelos de ratones KO mostrando respuestas inmunológicas alteradas. Así, ratones deficientes en VIP desarrollan inflamación pulmonar (Szema et al. 2006, Said et al. 2007) y ratones VPAC2-KO experimentan una colitis inducida por sulfato de dextrano y una **EEA** mucho más severas (Yadav et al. 2011). Abad y cols. (Abad et al. 2010) han descrito

que ratones VIP-KO exhiben resistencia al choque endotóxico y respuestas proinflamatorias disminuidas debido, en parte, a la presencia de un defecto intrínseco en la capacidad de respuesta de las células inflamatorias en ausencia crónica de VIP. Además, inesperadamente estos ratones son resistentes a la inducción de EEA, en este caso, los resultados sugieren que la pérdida de VIP afecta específicamente a la fase efectora de la enfermedad.

En relación con la implicación de los receptores de VIP, inicialmente se consideraba que el papel inmunoregulador de VIP estaba mediado de forma determinante por su receptor VPAC1, ya que utilizando agonistas de ambos receptores, la activación selectiva de VPAC1 era más efectiva en el control de la respuesta inmune que la de VPAC2 (Delgado et al. 2002b). Sin embargo, estudios con ratones deficientes para VPAC2, como se ha comentado anteriormente, han puesto de manifiesto la importancia también de este receptor, sugiriendo la participación directa de ambos receptores en la inmunoregulación llevada a cabo por VIP (Martínez et al. 2002, Lauenstein et al. 2011, Samarasinghe et al. 2011).

En humanos, se ha comprobado que respecto a controles sanos, las células inmunes de pacientes con patologías como la **AR**, la **EM** y la **OA** muestran una expresión de **VPAC1 reducida** y una respuesta a VIP reducida (Sun et al. 2006, Delgado et al. 2008a, Juarranz et al. 2008, Jimeno et al. 2015a). De hecho, en AR, se han identificado polimorfismos en la región 3'UTR del gen de VPAC1 que podrían tener relación con la disminución de su expresión y con la susceptibilidad a la enfermedad (Delgado et al. 2008a, Paladini et al. 2014). En el caso de **VPAC2**, los monocitos de pacientes con el síndrome de **Sjögren** presentan una expresión **incrementada** del receptor con una clara deficiencia en la fagocitosis de células apoptóticas (Hauk et al. 2014), mientras que en la **EM** las células Th1 parecen tener una **reducida** expresión de dicho receptor (Sun et al. 2006).

Todos estos resultados en su conjunto apuntan a que los **defectos** en la **expresión de VIP**, así como en las vías de **señalización** del mismo, podrían tener consecuencias importantes en enfermedades **inflamatorias** y **autoinmunes**.

5.7.2. EFECTO DE VIP EN LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS

La importancia del VIP en las enfermedades reumáticas fue demostrada por primera vez en el año 2001 por nuestro grupo, en el modelo experimental de **artritis inducida por colágeno** en ratón. En dicho modelo, VIP es capaz de modular tanto el componente inmune (regulando el equilibrio Th1/Th2) como el inflamatorio (bloqueando de la expresión de mediadores proinflamatorios), haciendo disminuir la incidencia y severidad de la

enfermedad mediante la inhibición de la formación del *pannus*, la destrucción del cartílago y la erosión del hueso (Delgado et al. 2001).

Los prometedores resultados en el modelo animal han conducido al estudio del efecto de VIP en **diversos tipos celulares de pacientes** con enfermedades reumáticas como la AR y la OA con interesantes resultados (Fig. 29):

- En linfocitos de sangre periférica (**PBLs**, *peripheral blood lymphocytes*) de pacientes con AR, VIP induce la **disminución de mediadores proinflamatorios** como TNF, IL-6 y las quimiocinas CCL2 y CXCL8. Además, tras estimulación de estas células, VIP promueve la **respuesta Th2** con aumento de producción de IL-4 e IL-10 (Gutiérrez-Cañas et al. 2008). De forma similar, en cultivos de FLS de AR y OA, VIP también produce ese efecto antiinflamatorio reduciendo los niveles de expresión de CCL2, CXCL8 e IL-6 (Juarranz et al. 2004).
- Los **FLS**, tanto en **AR** como en **OA**, expresan **VIP**, siendo esta expresión mayor en la OA. Además, estas células expresan receptores para el péptido, siendo mayor la expresión de **VPAC1** en la **OA** y la de **VPAC2** en la **AR**. En ninguno de los dos tipos de FLS se ha detectado expresión de PAC1 (Juarranz et al. 2008).
- VIP posee la capacidad de **modular la expresión de TLR-4** en FLS de pacientes con AR (Gutiérrez-Cañas et al. 2006, Juarranz et al. 2006) y, así mismo, puede actuar como regulador negativo de su cascada de **señalización** actuando a diferentes niveles (Arranz et al. 2008).
- Este péptido es capaz de regular el **perfil patogénico** de células implicadas en la patogénesis de la AR, tales como las **Th17** (Jimeno et al. 2015a, Jimeno et al. 2015b) y los **macrófagos** (Carrión et al. 2016).
- Por otro lado, VIP es capaz de **reducir** la expresión de **IL-22** por parte de los FLS de AR sometidos a estímulos inflamatorios, así como, de inhibir los efectos activadores de esta citocina sobre la proliferación y la expresión de MMP-1 y alarminas por parte de dichas células (Carrión et al. 2014). En la misma línea, este péptido contrarresta la acción de mediadores proinflamatorios sobre la expresión del IL-17R, la IL-12 y la IL-23, tanto en AR como en OA (Carrión et al. 2013).
- Además, VIP actúa como **regulador negativo** de la actividad de los **sensores de RNA (TLR-3, TLR-7, RIG-I, y MDA5)** en los FLS, ya que inhibe la translocación al núcleo de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, induciendo un descenso en la producción de IFN β y mediadores proinflamatorios (Carrión et al. 2011).

- Finalmente, VIP induce en los FLS la **disminución** de la expresión de las **ADAMTS**, enzimas esenciales en la patogénesis de la OA ya que degradan el agregado de la matriz extracelular alterando su integridad. Del mismo modo, reduce la expresión de la serín proteinasa **uPa** y las metaloproteinasas **MMP-9** y **MMP-13**. Así mismo, VIP reduce la activación de Runx2 y β catenina en los FLS artrósicos. En conjunto actúa como un protector frente a la destrucción del cartílago (Pérez-García et al. 2014, Pérez-García et al. 2016).

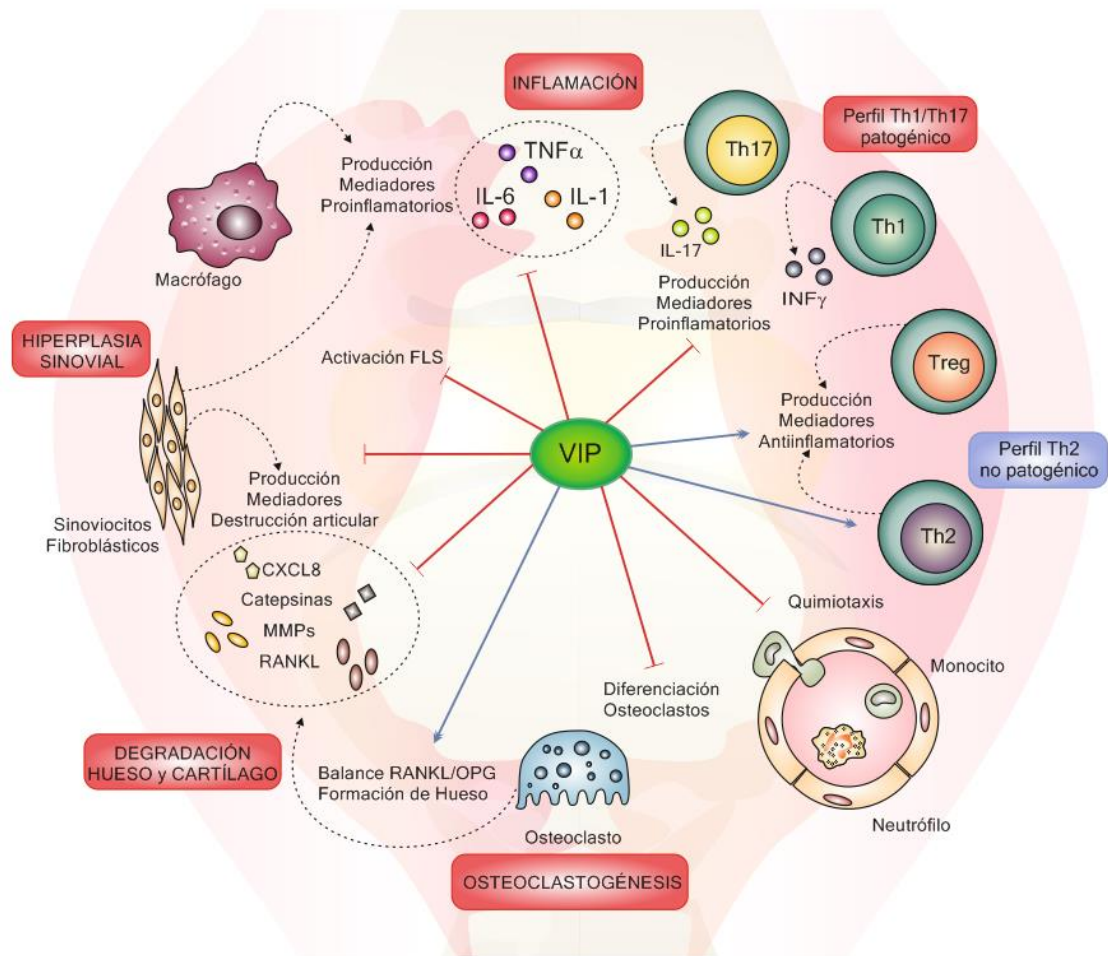


Figura 29. Principales acciones biológicas de VIP en la AR. Las flechas azules indican “inducción” y las flechas rojas “inhibición”.

5.7.3. VIP COMO AGENTE TERAPÉUTICO: LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

En clínica, comercializado bajo el nombre *Aviptadil*, el VIP se ha empleado con éxito en el tratamiento de la hipertensión pulmonar, la disfunción eréctil y la sarcoidosis. Sin embargo, el potencial de este péptido a nivel terapéutico en la práctica está aún muy lejos de su potencial teórico. Esta discordancia reside fundamentalmente en dos limitaciones. Por un lado, en el plasma VIP muestra una **alta sensibilidad** a la **degradación** tanto por proteasas,

como por hidrólisis espontánea y por anticuerpos catalíticos; así, su **vida media** tiene una duración de apenas **1-2 minutos** (Chu y Orłowski 1985, Vessillier et al. 2012). Por otra parte, debido a las interacciones cruzadas como fruto de su capacidad de unión a diferentes GPCRs, su pleiotropismo funcional y su ubiquidad, la administración sistémica de VIP puede causar **efectos secundarios** a nivel **cardiovascular** y **gastrointestinal**, incluyendo: caída de la presión arterial, taquicardia, enrojecimiento cutáneo y síndrome de diarrea acuosa (Bloom et al. 1973, Morice et al. 1983, Henning y Sawmiller 2001).

Así, la posibilidad de extender el uso terapéutico de VIP pasa por superar ambas limitaciones empleando **sistemas de distribución dirigidos** contra dianas concretas y que además **protejan al péptido** frente a su degradación.

Por un lado, se ha comprobado que la acetilación del extremo N-terminal de VIP supone un incremento de la estabilidad del péptido en el suero humano (Couvineau y Laburthe 2012b). Otras posibles estrategias incluyen: la administración de VIP junto con **inhibidores de las proteasas** (Tam et al. 1990, Wollman et al. 2002); el uso de **nanopartículas** metálicas, que parecen incrementar el potencial terapéutico de VIP tanto en términos de diana como de distribución (Fernandez-Montesinos et al. 2009, Klippstein y Pozo 2015); el uso de **liposomas** modificados con lipopéptidos conjugados con VIP, que han demostrado un reconocimiento selectivo de los VPACs y una actividad anti-tumoral más eficaz en un estudio reciente con líneas de osteosarcoma humano (Masaka et al. 2014) así como de **nanomicelas**, testadas en cáncer de mama (Onyuksel et al. 2009).

Recientemente, se han desarrollado **análogos** estables de los **receptores** VPAC1 y VPAC2, basados en la tecnología de los foldámeros, resistentes a peptidasas (Longevity Biotech), LBT3627 y LBT3393. Este último es un agente neuroprotector selectivo de VPAC2 que se ha investigado con éxito en la fase preclínica en un modelo de Parkinson (Olson et al. 2015).

Derivados estables de VIP con **formulaciones inhalables** se han probado con éxito en el tratamiento de la hipertensión pulmonar (Leuchte et al. 2008) y la sarcoidosis (Prasse et al. 2010). Así mismo, la terapia génica con VIP empleando **vectores lentivirales** ha generado buenos resultados en el modelo de CIA (Delgado et al. 2008b) y se han desarrollado también **vectores adenovirales** de VIP (Lodde et al. 2004). Sin embargo estas aproximaciones continúan careciendo de especificidad celular y tisular. Así, otra posibilidad bajo estudio son las **terapias celulares** con **células dendríticas** transducidas con un vector lentiviral de VIP (LentiVIP-CDs) cuyos efectos terapéuticos en modelos de sepsis y EEA han sido muy positivos con una única administración local (Toscano et al. 2010).

Objetivos

II. OBJETIVOS

En los últimos años, el establecimiento de consultas monográficas de AR y EspA de reciente comienzo ha contribuido a la implementación de estrategias terapéuticas personalizadas con un gran potencial en cuanto a la modificación del curso de la enfermedad, evitando el deterioro articular irreversible. En este contexto, la búsqueda de biomarcadores, que faciliten tanto en el diagnóstico como el pronóstico de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, es de vital importancia. Hasta la fecha, son insuficientes los biomarcadores validados en AR y EspA para la clasificación de pacientes con previsión de peor curso evolutivo y que, por tanto, se beneficiarían de un tratamiento temprano más agresivo.

El VIP, ampliamente reconocido como agente antiinflamatorio e inmunomodulador, así como sus receptores, muestran perfiles de expresión alterados en diversas enfermedades autoinmunes. De este modo, dicha desregulación podría resultar de gran utilidad como biomarcador de severidad en patologías de base autoinmune, como es el caso de las estudiadas en este trabajo.

Siendo el objetivo general de la presente Tesis Doctoral la **valoración y validación del eje VIP/Receptores como biomarcador pronóstico en Artritis Reumatoide y Espondiloartritis de reciente comienzo**, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la evolución de los niveles séricos de VIP a lo largo del seguimiento de una población de pacientes con AR temprana.
2. Analizar la relación entre los niveles séricos de VIP y la evolución clínica, la severidad de la enfermedad y los requerimientos de tratamiento, en pacientes con AR temprana.
3. Determinar la evolución de los niveles séricos de VIP a lo largo del seguimiento de una población de pacientes con EspA temprana.
4. Analizar la relación entre los niveles séricos de VIP y las manifestaciones características de la EspA, la evolución clínica y la actividad/severidad de la enfermedad.

5. Secuenciar el gen de VIP en subpoblaciones de pacientes con AR temprana que presenten fenotipos extremos de niveles séricos de VIP, en busca de variaciones genéticas que expliquen las diferencias de expresión.
6. Analizar la relación entre las variantes genéticas encontradas y parámetros indicadores de la severidad de la enfermedad en la AR temprana.
7. Caracterizar el patrón de expresión de los receptores de VIP (VPAC1 y VPAC2) en células mononucleares de sangre periférica de una población de pacientes con AR temprana.
8. Relacionar la expresión de VPAC1 y VPAC2 con la evolución clínica, el grado de inflamación sistémica y otros parámetros indicadores de la severidad de la enfermedad en pacientes con AR temprana.

Artículos

Artículo 1

*Serum Levels of **Vasoactive Intestinal Peptide** as a **Prognostic Marker** in **Early Arthritis**.*

Martínez C, Ortiz AM, Juarranz Y, Lamana A, **Seoane IV**, Leceta J, García-Vicuña R, Gomariz RP, González-Álvaro I. *PLoS One*. **2014** Jan 7;9(1):e85248. doi: 10.1371/journal.pone.0085248.

Serum Levels of Vasoactive Intestinal Peptide as a Prognostic Marker in Early Arthritis

Carmen Martínez^{1*}, Ana M. Ortiz², Yasmina Juarranz³, Amalia Lamana², Iria V. Seoane³, Javier Leceta³, Rosario García-Vicuña², Rosa P. Gomariz^{3,9}, Isidoro González-Álvaro^{2,9}

1 Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **2** Servicio de Reumatología, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, Madrid, Spain, **3** Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Objective: Suitable biomarkers are essential for the design of therapeutic strategies in personalized medicine. Vasoactive intestinal peptide (VIP) has demonstrated immunomodulatory properties in autoimmune murine and ex vivo human models. Our aim was to study serum levels of VIP during the follow-up of an early arthritis (EA) cohort and to analyze its value as a biomarker predicting severity and therapeutic requirements.

Methods: Data from 91 patients on an EA register were analyzed (76% rheumatoid arthritis (RA), 24% undifferentiated arthritis, 73% women, and median age 54 years; median disease duration at entry, 5.4 months). We collected per protocol sociodemographic, clinical, and therapeutic data. VIP levels were determined by enzyme immunoassay in sera harvested from the 91 patients (353 visits; 3.9 visit/patient) and from 100 healthy controls. VIP values below the 25th percentile of those assessed in healthy population were considered low. To determine the effect of independent variables on VIP levels, we performed a longitudinal multivariate analysis nested by patient and visit. A multivariate ordered logistic regression was modeled to determine the effect of low VIP serum levels on disease activity at the end of follow-up.

Results: VIP concentrations varied considerably across EA patients. Those fulfilling the criteria for RA had the lowest values in the whole sample, although no significant differences were observed compared with healthy donors. Disease activity, which was assessed using DAS28, inversely correlated with VIP levels. After a two-year follow-up, those patients with low baseline levels of VIP displayed higher disease activity and received more intensive treatment.

Conclusion: Patients who are unable to up-regulate VIP seem to have a worse clinical course despite receiving more intense treatment. Therefore, measurement of VIP levels may be suitable as a prognostic biomarker.

Citation: Martínez C, Ortiz AM, Juarranz Y, Lamana A, Seoane IV, et al. (2014) Serum Levels of Vasoactive Intestinal Peptide as a Prognostic Marker in Early Arthritis. PLoS ONE 9(1): e85248. doi:10.1371/journal.pone.0085248

Editor: Oliver Frey, University Hospital Jena, Germany

Received: August 7, 2013; **Accepted:** November 25, 2013; **Published:** January 7, 2014

Copyright: © 2014 Martínez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI08/0025, PI11/00195, PI11/00505, PI12/0758, RETICS RD08/0075, RD12/0009) and by FEDER funds from EU, S2010/BMD-2350 from Comunidad de Madrid. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: A patent application (P201230827) for the use of VIP as a marker of prognostic in autoimmune diseases has been deposited by the Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Universitario de la Princesa at the Oficina Española de Patentes y Marcas. The full name of the patent application is: VIP use as a prognostic marker of autoimmune diseases. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies.

* E-mail: cmmora@bio.ucm.es

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease with a heterogeneous clinical spectrum. At present, our ability to predict this heterogeneity is poor, likely because of limitations in understanding its molecular complexity. Recent efforts to improve outcome in patients with RA have focused on the early stages of the disease [1], when aggressive treatment can slow progression and change long-term course. Currently, another crucial therapeutic goal is to delay/prevent progression of undifferentiated arthritis (UA) and one of the challenges faced by rheumatologists is the classification of these patients. Thus, many studies have attempted to identify prognostic markers in early RA or UA that correlate with disease progression in order to establish which

patients are at risk for poor outcome or, conversely, which are destined to have a more benign disease so that overtreatment can be avoided [2]. However, criteria for this clustering of patients are scarce. To date, validated biomarkers of severity such as rheumatoid factor (RF) or anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA) do not enable us to identify those patients who require more intensive treatment. Although challenging, identification of such predictive tools would help us tailor treatment.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is produced by neural, endocrine, and immune cells. It has anti-inflammatory and immunoregulatory effects [3], which are mediated by three G-protein-coupled receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1) [4,5]. First studies evaluating the endogenous role of VIP were performed in transgenic mice harboring a chimeric VIP gene

Table 1. Baseline characteristics of patients with early arthritis.

	Rheumatoid arthritis (n = 69)	Undifferentiated arthritis (n = 22)	Total (n = 91)	P value
Age (years)	54 [45–66]	55 [44–69]	54 [45–66]	n.s.
Female gender (%)	78	54	73	0.004
Disease duration (months)	5 [3–8]	7 [3–11]	5.4 [3.2–8.4]	n.s.
GDAPa	46 [29–60]	46 [28–58]	46 [28–60]	n.s.
GDAPh	50 [30–72]	30 [14–50]	42 [25–66]	0.002
VAS Pain	52 [25–70]	48 [13–60]	50 [20–70]	n.s.
HAQ	1.125 [0.625–1.750]	0.875 [0.375–1.375]	1 [0.625–1.625]	n.s.
TJC	6 [2–12]	3 [0–10]	6 [1–12]	n.s.
SJC	7 [3–10]	3 [0–6]	5 [2–9]	0.004
ESR	32 [19–54]	17 [8–34]	30 [15–46]	0.006
CRP (mg/dl)	0.92 [0.2–1.96]	0.48 [0.1–0.82]	0.72 [0.16–1.7]	0.047
DAS28 (0–10)	5.0 [4.0–6.1]	3.6 [3.1–4.5]	4.8 [3.5–6.0]	0.002
RF (%)	54	18	45	0.004
ACPA+ (%)	60	14	49	<0.001
VIP (pg/ml)	342 [262–440]	375 [243–490]	352 [261–444]	n.s.

Data are shown as the median or percentage. GDAPa: global disease assessment by patient; GDAPh: global disease assessment by physician; VAS: visual analog scale; HAQ: health assessment questionnaire; TJC: tender joint count; SJC: swollen joint count; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; DAS28:28-joint count Disease Activity Score; RF: rheumatoid factor; ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies; VIP: vasoactive intestinal peptide. n.s.: not significant.
doi:10.1371/journal.pone.0085248.t001

which showed reduced brain VIP content and deficiencies in learning abilities supporting an important function for VIP in vivo [6]. Recently, it has been described that VIP-deficient mice display certain physiological abnormalities [7,8] and exhibit reduced mortality and impaired proinflammatory responses to lipopolysaccharide-induced endotoxemia [9], suggesting that defects in the innate arm of immunity may occur in the chronic absence of VIP. Numerous reports have focused on the effects of VIP treatment. Thus, administration of VIP has demonstrated therapeutic effects in several murine models of inflammatory/autoimmune diseases [10–14]. In a murine model of collagen-induced arthritis, administration of VIP reduced joint inflammation and destruction, thus decreasing the inflammatory response and inducing a shift in the Th1/Th2 balance [10,15]. Research in human models has confirmed the modulatory effects of VIP in *ex vivo* assays with fibroblast-like synoviocytes and peripheral blood lymphocytes from patients with RA through down-regulation of proinflammatory mediators [16–18]. Decreased expression of VIP was recently reported in the synovial fluid of patients with osteoarthritis (OA) and poor radiological progression, indicating a protective role for VIP [19]. Moreover, patients with juvenile idiopathic arthritis have lower serum levels of VIP than healthy controls [20].

Consequently, the role of endogenous VIP in the pathophysiology of RA is becoming clearer. Our hypothesis is that VIP serum levels are correlated with disease severity. Therefore, the objective of this work was to assess VIP levels during the follow-up of patients with early arthritis (EA) and to explore its potential value as a biomarker in RA.

Methods

Ethics Statement

The register protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee for Clinical Research at the Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa. All patients were informed about the study

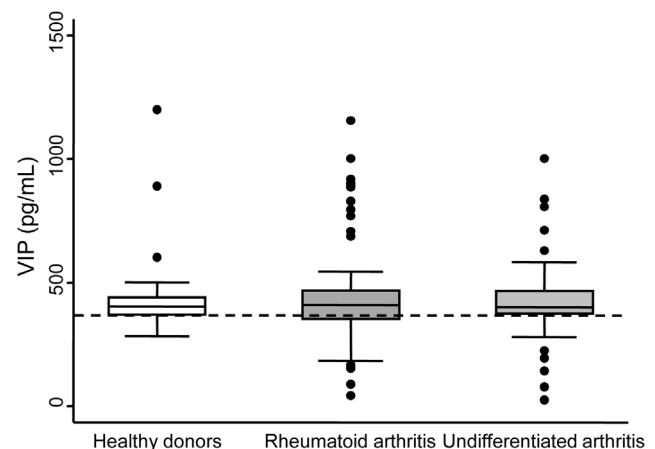


Figure 1. Variability of VIP levels in healthy controls (n = 100) and patients with early arthritis (Rheumatoid arthritis n = 69, Undifferentiated arthritis n = 22). Data are presented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), p90 (line above the box), and p10 (line below the box) of the serum VIP levels. Dots represent outliers. Dashed lines show the 25th percentile of the healthy donor group.
doi:10.1371/journal.pone.0085248.g001

and signed an informed consent form before inclusion in the EA register.

Patients and Controls

The study sample comprised 91 patients enrolled on our EA register. The inclusion criteria included more than 1 swollen joint for at least 4 weeks and symptoms for less than a year. Only data from patients fulfilling the 1987 American College of Rheumatology criteria for RA [21] within the 5-year follow-up (n = 69) or with chronic undifferentiated arthritis (n = 22) were analyzed.

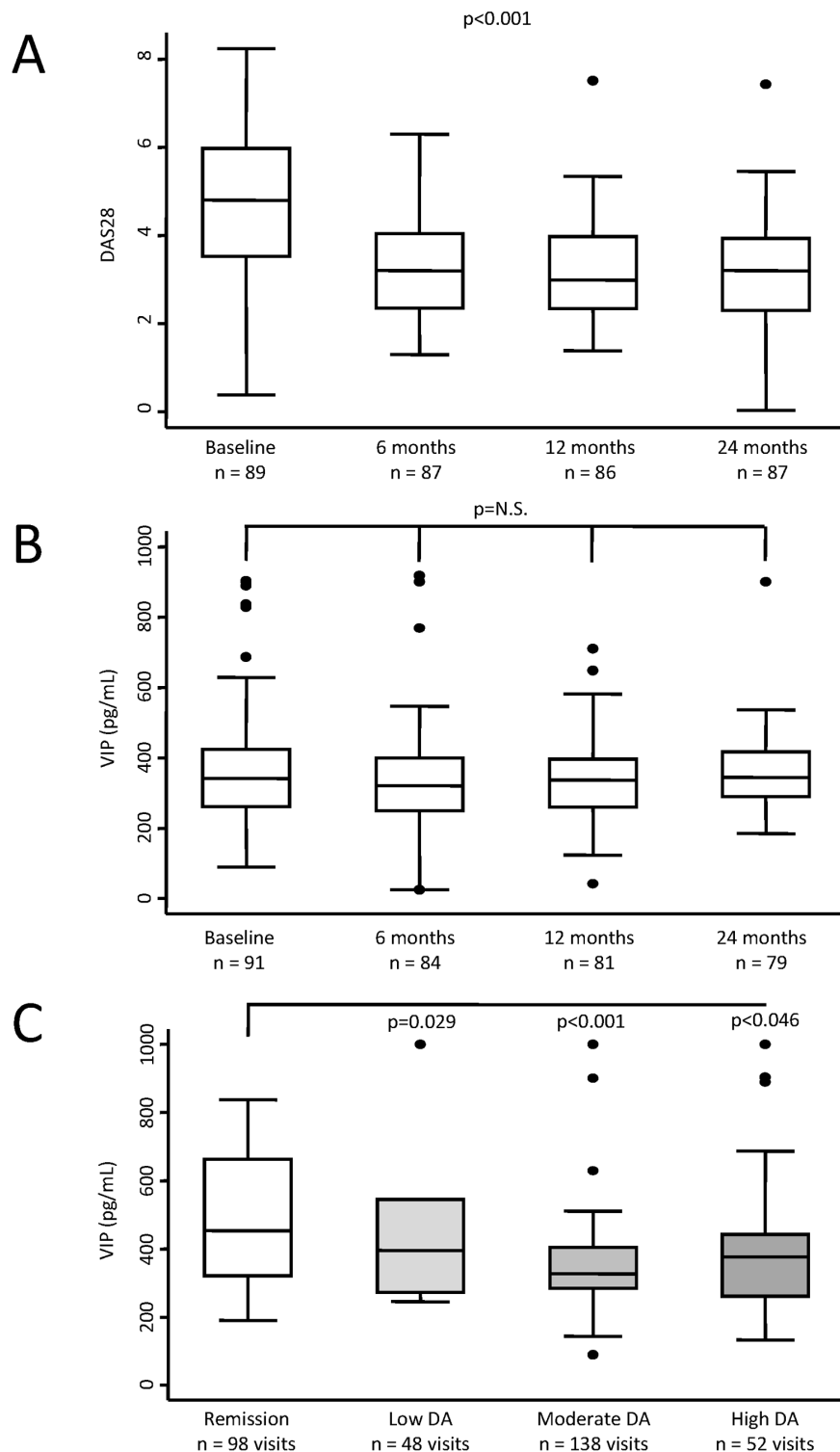


Figure 2. VIP serum levels correlate inversely with disease activity in patients with early arthritis. **A)** Progress of disease activity estimated by DAS28 at follow-up visits. **B)** Serum levels of VIP during the follow-up period. **C)** Serum VIP levels considering disease activity level. Data are presented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), p90 (line above the box), and p10 (line below the box) of the serum VIP levels. Dots represent outliers. Statistical significance was established using the Kruskal-Wallis test in panels A and B. In panel C the significance level is that obtained in the multivariable analysis displayed in Table 2, model 2. doi:10.1371/journal.pone.0085248.g002

Patients with diagnosis of spondyloarthritis, connective tissue diseases or crystal induced arthritis, were excluded from the

analysis. The register protocol included 5 visits (baseline, 6, 12, 24, and 60 months), and at each one we recorded the following data in

Table 2. Variables associated with VIP serum levels during follow-up of patients with early arthritis.

	Model 1		Model 2	
	β coeff \pm SE	P	β coeff \pm SE	P
Gender				
Male	Reference		Reference	
Female	0.108 \pm 0.067	0.106	0.105	0.086
Diagnosis				
RA	n.i.	n.s.	n.i.	n.s.
UA				
ACPA	n.i.	n.s.	n.i.	n.s.
Age (by 10 yr)	0.05 \pm 0.019	0.013	0.05 \pm 0.018	0.008
GDA Pat	n.i.	n.s.	n.i.	n.s.
GDA Phy	n.i.	n.s.	n.i.	n.s.
HAQ	n.i.	n.s.	n.i.	n.s.
SJC	n.i.	n.s.	n.i.	n.s.
MS	n.i.	n.s.	n.i.	n.s.
DAS28	-0.027 \pm 0.014	0.045	–	–
Disease activity				
Remission	–	–	Reference	
Low			-0.094 \pm 0.043	0.029
Moderate			-0.187 \pm 0.049	<0.001
High			-0.113 \pm 0.057	0.046
Leflunomide (mg/d)	n.i.	n.s.	n.i.	n.s.
TNF blockers	0.183 \pm 0.075	0.01	0.165 \pm 0.065	0.011

The longitudinal analysis was performed with data (logarithmic transformation of censored VIP levels; see figure S2) from 340 visits corresponding to the 88 patients with all information available in, at least, two visits. Model 1 was fitted using the continuous value of DAS28 as measure of disease activity while model 2 includes the categorical variable based in cut-off values of this index. The average number of visits by patient was 3.9. The table shows all the variables reaching $p < 0.15$ at the bivariate analysis (see Methods section for further information on multivariable analysis modeling). Coeff: coefficient; CI: confidence interval; RA: rheumatoid arthritis; UA: undifferentiated arthritis; ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies; yr, year; GDA: global disease assessment; Pat: patient; Phy: physician; HAQ: health assessment questionnaire; SJC: swollen joint count; MS: morning stiffness; DAS28, 28-joint Disease Activity Score; TNF: tumor necrosis factor; n.s.: not significant; n.i.: not included. doi:10.1371/journal.pone.0085248.t002

an electronic database: clinical and demographic information; disease duration at the beginning of follow-up; 28-joint Disease Activity Score (DAS28) [22]; global disease activity on a 100-mm visual analogue scale assessed by both the patient and the physician; Health Assessment Questionnaire score (HAQ; Spanish version) [23]; and the results of laboratory tests including erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), rheumatoid factor (RF, assessed by nephelometry; positive >20 IU/ml), and anti-citrullinated peptide antibody (ACPA, measured by enzyme immunoassay [EIA]; Euro-Diagnostica Immunoscan RA; positive >50 IU/ml).

Healthy donors ($n = 100$) were recruited from the Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. Following the Spanish Personal Data Protection Law, their demographic information was confidential.

Measurement of Serum VIP

VIP levels were determined using a competitive EIA with a commercially available kit according to the manufacturer's instructions (Phoenix Pharmaceutical, Karlsruhe, Germany). We previously optimized sample preparation procedure to obtain optimal results. First, it was tested the extraction of peptides from serum using a SEP-COLUMN containing 200 mg of C18, according to the manufacturer's recommendations. Second, serum samples were concentrated by using a lyophilizer to assay different concentrations. Then, VIP levels were determined. The best results were obtained in reconstituted dried extract (2:1) without the use of columns. The assay was performed as follow, briefly, the samples were freeze-dried and dissolved in EIA buffer (2:1), added to an immunoplate pre-coated with a secondary antibody, and incubated with biotinylated VIP and a primary antibody whose Fab fragment competitively binds to the biotinylated peptide and targeted peptide in samples. After washes, the wells were incubated with streptavidin-horseradish peroxidase, which catalyzed the oxidation of the substrate solution. The reaction was stopped using the stop solution and absorbance measured at 450 nm. A standard curve of known concentration was established. The concentration in the samples was determined by extrapolation to this curve and by applying the corresponding dilution factor. Samples from each patient were assayed twice. The minimum detectable concentration was 0.12 ng/ml of sample, with an intra-assay and interassay variation of $\leq 5\%$ and 15% , respectively.

Since serum samples were stored at -80°C for different periods of time until assay (range, 1 to 112 months), we first analyzed the effect of sample frozen-time on the ability of our assay to detect VIP. As shown in Figure S1, no significant correlation was observed between VIP serum level and frozen-time.

Statistical Analysis and New Variables

Normally distributed quantitative variables were expressed as the mean \pm standard deviation, while non-normally distributed variables were expressed as the median and interquartile range (IQR). Qualitative variables were described using an estimation of the proportions. Variables with a normal distribution were analyzed using the t test, while the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests were used for variables with a non-normal distribution. A χ^2 test or the Fisher exact test was used to compare categorical variables.

Considering that the raw data contained considerably left-shifted values (Figure S2A), we decided to censor values higher than 1000 pg/ml in this figure (Figure S2B) to avoid missing information if patients with very high VIP values were excluded. In addition, since the censored variable does not show a Gaussian distribution, data were normalized through logarithmic transformation (Figure S2C).

Additional variables were defined to further describe the role of VIP in the progress of arthritis. VIP levels were considered to be low when the concentration was below the 25th percentile of its concentration in the healthy population (370 pg/ml). The intensity of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) treatment (IDT) was assessed as the number of days of treatment with each DMARD during follow-up adjusted for weighted coefficients, as described elsewhere [24].

To identify factors that influenced VIP levels during follow-up (logarithmic transformation of the censored VIP levels as the dependent variable), we used data from 340 visits in the 88 patients with all information available in at least 2 visits to fit a population-averaged model by means of generalized linear models nested by patient and visit using the *xtee* command of Stata 12 for

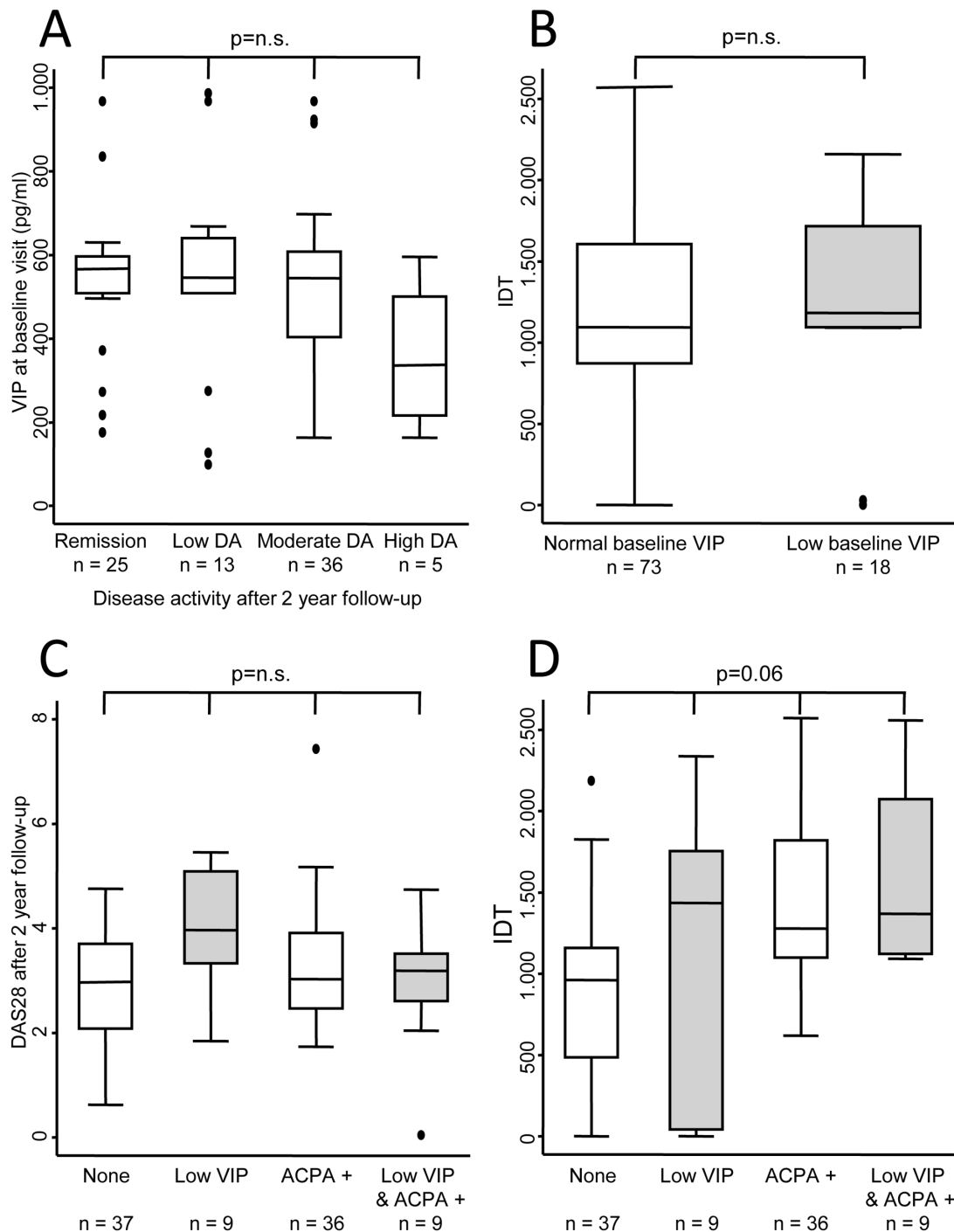


Figure 3. Serum VIP level as a prognostic marker. **A)** VIP levels at baseline according to the degree of disease activity after two years of follow-up. **B)** Intensity of treatment in two subpopulations of early arthritis patients clustered according to serum VIP level. Cumulative DMARD treatment during the follow-up period was estimated using the intensity of DMARD treatment (IDT) variable (see Methods). **C)** Disease activity estimated by DAS28 after two years of follow-up in a population of patients with early arthritis according to VIP levels and the presence of anti-citrullinated peptide antibody (ACPA+). **D)** Intensity of DMARD treatment in different subpopulations clustered by serum VIP levels and the presence of ACPA. Data are presented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), p90 (line above the box), and p10 (line below the box). Dots represent outliers. Statistical significance was established using the Kruskal-Wallis test in panels A, C and D or Mann-Whitney test in panel B.

doi:10.1371/journal.pone.0085248.g003

Windows (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). The population-averaged generalized estimating equations were first modeled by adding all variables with a p value <0.15 in the

bivariate analysis. The final models were constructed using a quasi-likelihood estimation based on the independence model

Table 3. Effect of low baseline VIP levels in serum on disease activity after a two-year follow-up.

	Odds ratio (95% CI)	P
Age (years)		
<45	Ref.	
45–65	–	n.s.
>65	–	n.s.
Gender		
Man	Ref.	
Woman	4.35 (1.46–12.99)	0.008
Diagnosis		
RA	Ref.	
UA	–	n.s.
Positive RF	–	n.s.
Interaction VIP, ACPA		
Normal VIP, ACPA-negative	Ref.	
Low VIP, ACPA-negative	6.11 (1.28–29.22)	0.023
Normal VIP, ACPA-positive	0.68 (0.24–1.9)	0.458
Low VIP, ACPA-positive	0.24 (0.03–1.85)	0.170
DMARD treatment		
None	Ref.	
Monotherapy	2.2 (0.30–12.96)	0.437
Combined therapy	6.62 (0.84–51.93)	0.071
Baseline DAS28	–	n.s.
Cutpoints	β coeff. (95% CI)	
Remission/Low disease activity	1.59 (–0.40 to 3.59)	–
Low/Moderate disease activity	2.46 (0.44–4.49)	–
Moderate/High disease activity	5.97 (3.57–8.38)	–

DAS28:28-joint Disease Activity Score; HAQ: Health Assessment Questionnaire; Coeff.: coefficient; Ref.: reference; RA: rheumatoid arthritis; UA: undifferentiated arthritis; ACPA: anti-citrullinated peptide antibody; n.s.: not significant.
doi:10.1371/journal.pone.0085248.t003

information criterion [25] and Wald tests, after removing all variables with $p > 0.15$.

To determine the usefulness of baseline VIP levels for predicting disease progress, we performed an ordered logistic model using the *ologit* command of Stata 12. The dependent variable was the disease activity level at the 2-year follow-up, using the cut-off points for DAS28 proposed by Prevoo et al. (<2.6, remission; 2.6 to 3.2, low disease activity; 3.2 to 5.1, moderate disease activity; >5.1 high disease activity) [22]. In this model, the dependent variable considered remission as 0 and low, moderate, and high disease activity as 1, 2, and 3. Thus, the ordered logistic analysis can also estimate cut-off points that aid the interpretation of the coefficients for each independent variable according to the levels of the dependent variable. The analysis was modeled as described above for *xtgee*.

The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Characteristics of Patients with EA. VIP Levels in Patients and Healthy Donors

A total of 91 patients with RA ($n = 69$) or UA ($n = 22$) were included in the study. The main difference between these two

subgroups was a higher frequency of female patients in the RA group, in which more severe disease at baseline and a higher prevalence of RF and ACPA positivity were also found (Table 1). No significant differences were detected between the groups in variables expressing a subjective component such as pain, global disease assessment by patient, tender joint count, and HAQ.

Considering serum levels of VIP at baseline, no significant differences were detected between the groups (Table 1) or between patients and healthy controls (Figure 1). Nevertheless, the distribution of the VIP serum concentration was considerably heterogeneous, especially among RA patients, and ranged from 100 to >1000 pg/ml. In addition, the lowest levels of VIP tended to be more frequent in RA and UA patients than in healthy donors (Figure 1).

Low VIP Levels are Associated with Higher Disease Activity in Patients with EA

Despite a significant decrease in disease activity during follow-up (Figure 2A), we could not detect a parallel down-regulation of serum VIP levels (Figure 2B). Therefore, we performed a multivariate analysis to achieve a more accurate appraisal of the potential relationship between VIP levels and disease activity in patients with EA. Our data showed that elderly patients expressed slightly but significantly higher serum levels of VIP during follow-up (Table 2 and Figure S3). In addition, VIP levels tended to be significantly higher in visits at which patients were treated with TNF blockers. Interestingly, after adjustment for these confounders, we observed a significant and negative correlation between disease activity, estimated through DAS28, and VIP serum levels (Table 2, model 1).

Next, we analyzed the concentration of VIP at the different visits after clustering the results in four groups: remission, low, moderate, and high disease activity. As shown in Figure 2C, we observed lower levels of VIP in those visits with moderate or high activity compared to visits at which patients were in remission and those differences reached statistical significance after adjusting by confounders (Table 2, model 2). However, this approach did not reveal whether inflammation induced low VIP levels or those patients with low VIP showed more intense disease activity.

Low Baseline VIP Serum Levels as a Biomarker of Disease Severity

Next, we studied whether having low VIP serum levels at baseline could predict long-term disease activity. As Figure 3A shows, those patients who continued to have high or moderate disease activity levels after a two-year follow-up had lower baseline VIP serum levels. This behaviour was detected despite the observed trend toward higher prescription of DMARDs in patients with low VIP serum levels (Figure 3B).

In view of the various confounding factors that could influence disease activity level after two years of follow-up, we performed a multivariate ordered logistic regression to determine which variables contribute to an increased level of disease activity. Female patients showed an odds ratio (OR) of 4.3 for poorer disease outcome than male patients (Table 3). In addition, patients requiring combined therapy displayed an OR of 6.6 for remaining at a higher disease activity level than those who did not require DMARDs. After adjustment for these confounders, having low baseline VIP levels was associated with a higher level of disease activity after two years of follow-up. However, marked interference with ACPA positivity was observed (Table 3). Thus, patients with low VIP serum levels but negative ACPA had an OR of 6.1 for being at a higher disease activity level than those with negative

ACPA levels and normal VIP serum levels (Table 3 and Figure 3C). By contrast, patients with positive ACPA levels showed a nonsignificant trend toward lower disease activity regardless of VIP levels (Table 3 and Figure 3C). In addition, the model revealed that the effect of gender, treatment, and baseline VIP level was more intense when the level of disease activity increased (β coefficients for cutpoints in Table 3).

In terms of treatment, ACPA positivity was associated with higher prescription of DMARDs, as occurred when low VIP levels were associated with ACPA positivity (Figure 3D). More heterogeneous regimens were found in patients with low VIP levels (treating physician blinded) and negativity for ACPA, but they undoubtedly received more intensive treatment than the population that met neither of these conditions (Figure 3B and 3D).

Discussion

Rheumatoid arthritis is a complex heterogeneous disease resulting from the interaction between genetic and environmental triggers and from the intervention of key molecules that modulate its severity. To date, there are no published data demonstrating an association between abnormal regulation of VIP and an increased risk for developing RA. However, growing evidence supports the ability of VIP to regulate the intensity of the inflammatory process and the immune response that contribute to the pathogenesis of rheumatic diseases [26]. In this work, we showed that the lowest values of serum VIP levels were clustered in the EA group, despite no significant differences compared with healthy donors. Furthermore, our results reveal an inverse correlation between disease activity and VIP concentration in serum. Thus, patients with lower VIP levels showed higher DAS28 scores, and, conversely, higher VIP levels were detected in the group of patients in remission and in those with significantly weaker disease activity.

Several experimental findings support this observation. Treatment with VIP reduced the incidence and severity of arthritis in murine models of RA by decreasing the production of proinflammatory cytokines and chemokines, and inducing a shift in the Th phenotype from a Th1-type toward a Th2-type response and generating efficient regulatory T cells [10,27]. In human fibroblast-like synoviocytes from RA patients, VIP downregulated the expression and production of proinflammatory cytokines, chemokines and COX2 as well as the production of IFN β , CXCL8, and the matrix metalloproteinase-3 induced by TLR ligands [16,17,28].

Given the above evidence on the role of VIP, it seems reasonable that patients in whom production of this immunoregulatory peptide did not increase have more severe autoimmune and inflammatory responses and poor outcomes. In close correlation with our data, expression of VIP in synovial fluid and articular cartilage from patients with OA was negatively associated with progressive joint damage as a potential indicator of disease severity, thus suggesting that VIP could play a protective role in progression of OA [19]. Moreover, low serum levels of VIP have been described in patients with juvenile idiopathic arthritis who show clinical evidence of cardiac autonomic neuropathy associated with a parasympathetic dysfunction. In these patients, a significant positive association was found between cardiac autonomic neuropathy and major disease manifestations, including activity; therefore, the authors suggested that serum VIP should be assessed in these patients [20].

Although several parameters (eg, RF, ACPA, ESR, and CRP) have been proposed as predictors of long-term outcome of EA, they enable us to classify only 65% of patients [2,24,29–31].

Furthermore, as RF and ACPA largely overlap, identifying new prognostic markers would be essential for providing complementary information in order to improve the performance of a biomarker-guided strategy. In this setting, the association between VIP levels and disease activity reported here suggests that baseline serum VIP could be a feasible biomarker that enables EA patients to be stratified for therapeutic decision making. In fact, our data support that measurement of serum VIP levels at baseline enhances the predictive value of ACPA in determining long-term outcome in patients with EA. Thus, ACPA-negative patients with low VIP serum levels had a higher degree of disease activity than ACPA-negative patients with normal serum VIP levels and an even higher degree of disease activity than ACPA-positive patients. This finding likely reflects selection bias, since the presence of ACPA, a recognized marker of poor prognosis to which the attending rheumatologist was not blinded, was associated with more intense prescription of DMARDs. As a consequence, ACPA-positive patients with normal VIP showed similar disease activity to ACPA-negative patients with normal VIP. Interestingly, although the difference was not significant, ACPA-positive patients with low VIP serum levels had a slightly higher degree of disease activity and a greater requirement for DMARDs than ACPA-positive patients with normal VIP serum levels. On the other hand, ACPA-negative patients with low VIP levels received more heterogeneous treatment, probably because of the lack of a suitable marker, since physicians were entirely unaware of the value of this parameter.

An additional advantage of VIP as a prognostic marker is its scarce variation during follow-up, which indicates that VIP levels depend on the individual and do not change owing to external factors during follow-up. Thus, VIP concentrations could predict the outcome of arthritis independently of the treatment prescribed and the phase of the disease.

Our study is subject to a series of limitations. First, our data show that elderly patients have slightly but significantly higher serum levels of VIP. However, as demographic information in the healthy volunteers was confidential, we were unable to draw a comparison with the patients. In this regard, the correlation between VIP levels and gender and age has received little attention in the literature. The only study that does examine this correlation found no differences in VIP concentrations between men and women with secondary hyperparathyroidism undergoing dialysis [32]. Nevertheless, variation attributable to age in our study is lower than individual variability among EA patients (Figure S3). Second, the absence of a pre-established treatment strategy in our unit means that variations in the prescription of DMARDs by the rheumatologists involved in the study could interfere with the results. Third, considering the dispersion of VIP values owing to the variability of ELISA, we had to apply mathematical modifications to optimize the statistical analysis, thus hampering implementation in daily clinical practice.

Our study has the following strengths. First, exhaustive and rigorous collection of data on treatment with DMARDs goes some way to resolving the second limitation. VIP levels were measured retrospectively; therefore, the rheumatologists were blinded to serum VIP levels but not to ACPA reactivity when they selected therapy. Consequently, they were able to prescribe more intensive treatment to ACPA-positive patients. Second, we included a high number of samples and clinical data (about 4 visits per each of the 91 patients).

In conclusion, our study demonstrates that EA patients with low baseline VIP levels have worse disease outcome. Validation of the predictive value of serum VIP levels would enable earlier and

more intensive treatment of patients with the most aggressive forms of RA.

Supporting Information

Figure S1 Frozen storage does not affect the measurement of serum VIP levels. VIP concentration at serum from samples stored from one month to 10 years is shown. The red line represents the linear prediction obtained with the command *lfit* of Stata 12.
(TIF)

Figure S2 Normalization of the VIP serum levels variable in order to obtain a distribution closer to Gaussian.
(TIF)

Figure S3 Correlation between age and VIP serum levels. Data are shown as dot plot and the exponential linear

prediction with 95% confidence interval at ages 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80. These data were obtained using the command *marginsplot* of Stata 12 after performing the multivariable analysis displayed in Table 2 (dependent variable logarithmic transformation of censored VIP).
(TIF)

Acknowledgments

The authors are grateful to the patients of the EA Register and to the Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid for recruiting healthy donors.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CM AMO RPG IG-A. Performed the experiments: CM YJ AL IVS IG-A AMO JL. Analyzed the data: IG-A CM RPG AMO. Wrote the paper: CM IG-A RPG RG-V.

References

- Schoels M, Knevel R, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, et al. (2010) Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search. *Ann Rheum Dis* 9: 638–643.
- Smolen JS, Aletaha D, Grisar J, Redlich K, Steiner G, et al. (2008) The need for prognosticators in rheumatoid arthritis. Biological and clinical markers: where are we now? *Arthritis Res Ther* 10: 208–219.
- Gomariz RP, Juarraz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, et al. (2006) VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1070: 51–74.
- Couvineau A, Laburthe M (2012) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol* 166: 42–50.
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V et al. (2012) Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *Br J Pharmacol* 166: 4–17.
- Gozes I, Glowa J, Breneman DE, McCune SK, Lee E, et al. (1993) Learning and sexual deficiencies in transgenic mice carrying a chimeric vasoactive intestinal peptide gene. *J Mol Neurosci* 4: 185–193.
- Szema AM, Hamidi SA, Lyubsky S, Dickman KG, Mathew S et al. (2006) Mice lacking the VIP gene show airway hyperresponsiveness and airway inflammation, partially reversible by VIP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L880–886.
- Colwell CS, Michel S, Itri J, Rodriguez W, Tam J et al. (2003) Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R939–949.
- Abad C, Tan YV, Cheung-Lau G, Nobuta H and Waschek JA (2012) VIP deficient mice exhibit resistance to lipopolysaccharide induced endotoxemia with an intrinsic defect in proinflammatory cellular responses. *PLOS One* 7: e36922.
- Delgado M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Gomariz RP (2001) Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 7: 563–568.
- Delgado M, Martínez C, Pozo D, Calvo JR, Leceta J, et al. (1999) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF- α and IL-6. *J Immunol* 162: 1200–1205.
- Abad C, Martínez C, Juarraz MG, Calvo JR, Leceta J, et al. (2003) Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124: 961–971.
- Jimeno R, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Martínez C, Juarraz Y, et al. (2010) New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol* 88: 734–745.
- Abad C, Waschek JA (2011) Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Curr Pharm Des* 17: 1025–1035.
- Juarraz Y, Abad C, Martínez C, Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, et al. (2005) Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7: R1034–R1045.
- Juarraz MG, Santiago B, Torroba M, Gutiérrez-Cañas I, Palao G, et al. (2004) Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology* 43: 16–22.
- Carrión M, Juarraz Y, Pérez-García S, Jimeno R, Pablos JL, et al. (2011) RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum* 63: 1626–1636.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarraz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, et al. (2008) Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: Implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 22: 312–317.
- Jiang W, Gao SG, Chen XG, Xu XC, Xu M, et al. (2012) Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: A new indicator of disease severity? *Clin Biochem* 45: 1607–1612.
- El-Sayed ZA, Mostafa GA, Aly GS, El-Shahed GS, El-Aziz MM, et al. (2009) Cardiovascular autonomic function assessed by autonomic function tests and serum autonomic neuropeptides in Egyptian children and adolescents with rheumatic diseases. *Rheumatology* 48: 843–848.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, et al. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31: 315–324.
- Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, et al. (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 44–48.
- Esteve-Vives J, Batlle-Gualda E, Reig A (1993) Spanish version of the Health Assessment Questionnaire: reliability, validity and transcultural equivalency. Grupo para la Adaptación del HAQ a la Población Española. *J Rheumatol* 20: 2116–2122.
- González-Alvaro I, Ortiz AM, Alvaro-Gracia JM, Castañeda S, Díaz-Sánchez B, et al. (2011) Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis. *PLOS One* 6: e29492.
- Pan W (2001) Model selection in estimating equations. *Biometrics* 57: 529–534.
- Gonzalez-Rey E, Anderson P, Delgado M (2007) Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: a new approach for autoimmune therapy. *Ann Rheum Dis* 66 Suppl 3: iii70–76.
- Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Chorny A, Delgado M (2006) Vasoactive intestinal peptide induces CD4+CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 864–876.
- Pérez-García S, Juarraz Y, Carrión M, Gutiérrez-Cañas I, Margioris A, et al. (2011) Mapping the CRF-urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts: effect of vasoactive intestinal peptide. *J Cell Physiol* 226: 3261–3269.
- de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Verpoort KN, Schreuder GM, Ewals JA, et al. (2008) Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies. *Arthritis Rheum* 58: 1293–1298.
- Raza K, Filer A (2009) Predicting the development of RA in patients with early undifferentiated arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 23: 25–36.
- Szodoray P, Szabo Z, Kapitany A, Gyetvai A, Lakos G, et al. (2010) Anticitrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 9: 140–143.
- Diez JJ, Miguel JL, Codoceo R, Iglesias P, Bajo MA, et al. (2008) Effects of cinacalcet on gastrointestinal hormone release in patients with secondary hyperparathyroidism undergoing dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 23: 1387–1395.

Artículo 2

Vasoactive Intestinal Peptide in Early Spondyloarthritis: Low Serum Levels as a Potential Biomarker for Disease Severity

Seoane IV, Tomero E, Martínez C, García-Vicuña R, Juarranz Y, Lamana A, Ocón E, Ortiz AM, Gómez-León N, González-Álvaro I, Gomariz RP. *J Mol Neurosci*. **2015** Jul;56(3):577-84. doi: 10.1007/s12031-015-0517-6.

Vasoactive Intestinal Peptide in Early Spondyloarthritis: Low Serum Levels as a Potential Biomarker for Disease Severity

Iria V. Seoane · Eva Tomero · Carmen Martínez · Rosario Garcia-Vicuña ·
Yasmina Juarranz · Amalia Lamana · Elena Ocón · Ana M. Ortiz ·
Nieves Gómez-León · Isidoro González-Álvaro · Rosa P. Gomariz

Received: 12 January 2015 / Accepted: 4 February 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Spondyloarthritis (SpA) is a family of inflammatory diseases sharing clinical, genetic, and radiological features. While crucial for tailoring early interventions, validated prognostic biomarkers are scarce in SpA. We analyze the correlation between serum levels of vasoactive intestinal peptide (VIP) and disease activity/severity in patients with early chronic inflammatory back pain. The study population comprised 54 patients enrolled in our early chronic inflammatory back pain register. We collected demographic information, clinical data, laboratory data, and imaging findings. VIP levels were measured by enzyme immunoassay in serum samples from 162 visits. The association between independent variables and VIP levels was analyzed using longitudinal multivariate analysis nested by patient and visit. No significant differences were observed in VIP levels between these two groups. Lower levels of VIP were significantly associated

with a higher Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASFI) score, presence of bone edema in magnetic resonance imaging (MRI) scan, and lower hemoglobin levels. Coexistence of cutaneous psoriasis was independently associated with lower VIP levels, and similar trend was observed for enthesitis. We conclude that SpA patients with low serum VIP levels had worse 2-year disease outcome, suggesting that serum VIP levels could be a valid prognostic biomarker.

Keywords Neuroimmunomodulation · Spondyloarthritis · Vasoactive intestinal peptide · Prognosis biomarker · Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index

Introduction

Spondyloarthritis (SpA) is a family of interrelated rheumatic diseases that share clinical and radiological manifestations; the most prevalent and paradigmatic member of the group is ankylosing spondylitis (Dougados and Baeten 2011). SpA comprises a wide variety of skeletal and extra-skeletal phenotypes that are associated with the presence of the HLA-B27 antigen, which accounts for familial association and can explain recent hallmark findings on pathogenesis (Colbert et al. 2010). Compared with joint involvement in rheumatoid arthritis (RA), inflammation in SpA mainly takes the form of enthesitis and commonly results in bone formation and ankylosis rather than bone erosion (Marzo-Ortega et al. 2002; McGonagle et al. 2014). Nevertheless, the consequences of these changes also lead to functional limitations, poor quality of life, loss of working hours, and even decreased life expectancy (Braun and Pincus 2002; Fabreguet et al. 2012). Prognosis is often poorer because of the delay in

Isidoro González-Álvaro and Rosa P. Gomariz share senior authorship.

Iria V. Seoane and Eva Tomero contributed equally to this work.

I. V. Seoane · Y. Juarranz · R. P. Gomariz (✉)
Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología,
Universidad Complutense de Madrid, Antonio Novais, no. 2, Ciudad
Universitaria, 28040 Madrid, Spain
e-mail: gomariz@bio.ucm.es

E. Tomero · R. Garcia-Vicuña · A. Lamana · A. M. Ortiz ·
I. González-Álvaro (✉)
Servicio de Reumatología, Hospital Universitario de la Princesa,
Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, Madrid, Spain
e-mail: isidoro.ga@ser.es

C. Martínez
Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina,
Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

E. Ocón · N. Gómez-León
Servicio de Radiodiagnóstico, Hospital Universitario de la Princesa,
Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, Madrid, Spain

diagnosis, especially in patients with isolated axial involvement (Rudwaleit et al. 2005). This was particularly true until 5–10 years ago, when diagnosis could only be confirmed based on radiological damage (van der Linden et al. 1984). New classification criteria enable SpA to be diagnosed before radiologic evidence of disease is available (Rudwaleit et al. 2009b), and magnetic resonance imaging (MRI) now plays a key role in the early identification of patients with SpA (Bennett et al. 2009). Nonetheless, diagnosis of non-radiologic SpA remains a challenge, since, in most cases, the first manifestation is low back pain, a common complaint in the general population (Carmona et al. 2001; Deyo and Weinstein 2001).

Biologics, mainly TNF blockers, are the second major advance in the management of SpA (Machado et al. 2013). However, given the considerable heterogeneity in the clinical manifestations of these disorders, ranging from self-limiting to chronic severe and progressive forms (Dougados and Baeten 2011), and concerns over safety and cost, the use of TNF blockers should be restricted to patients with an optimal risk-benefit ratio. Prognostic markers such as C-reactive protein (CRP) levels, smoking, HLA-B27 positivity, and structural damage at diagnosis have been associated with progression of radiological damage (Chung et al. 2012; Marzo-Ortega et al. 2009; Poddubnyy et al. 2012); however, validated biomarkers for predicting progression are lacking and early detection of candidates for TNF blockade remains difficult.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a molecule of the neuroendocrine-immune network with demonstrated immunoregulatory properties (Gomariz et al. 2006; Leceta et al. 2007). Treatment with VIP has been shown to reduce the severity of arthritis in murine models (Delgado et al. 2001; Juarranz et al. 2005) and improves the course of other inflammatory models in mice (Abad et al. 2003; Jimeno et al. 2010; Li et al. 2006; Lodde et al. 2006). In human assays, *in vitro* use of VIP regulated differentiation of T cells, modulated the balance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (Gutierrez-Canas et al. 2008), and decreased expression of several proinflammatory pathways in synovial fibroblasts (Carrion et al. 2011, 2014; Gutierrez-Canas et al. 2006). We recently reported that early arthritis patients with low baseline serum VIP levels have a more severe disease course and require more intensive treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) (Martinez et al. 2014). In addition, reduced VIP expression has been observed in the synovial fluid of osteoarthritis patients with a poorer disease course (Jiang et al. 2012). The aim of this study, therefore, was to elucidate the potential role of VIP serum levels as a biomarker of severity in early inflammatory back pain.

Material and Methods

Ethics Statement

The register protocol for the early chronic inflammatory back pain (CIBP) clinic at Hospital Universitario La Princesa was reviewed and approved by the Ethics Committee for Clinical Research at Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa. Consecutive patients who attended the early CIBP clinic from June 2010 to June 2013 were recruited. All patients were informed about the study and signed an informed consent form before their inclusion in the register.

Patients

The study sample comprised 54 patients from the register. The inclusion criteria are inflammatory back pain (IBP) for more than 3 months and less than 2 years, and symptom onset before age 45 years.

The register protocol comprised three prospective visits (baseline, 1 and 2 years). The data recorded at baseline include gender, age, ethnicity, and educational and occupational status. At each visit, we systematically collect clinical and laboratory data, as follows: date of onset of IBP, specific features of SpA (enthesitis, arthritis, uveitis, psoriasis, and inflammatory bowel disease), previous infections and family history of SpA. Patients were asked to complete the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (Garrett et al. 1994) and Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) (Calin et al. 1994). The laboratory parameters recorded include HLA-B27 positivity, CRP levels, erythrocyte sedimentation rate (ESR), alkaline phosphatase (ALP), and hemoglobin (Hb) among other parameters. In addition, serum samples were taken and stored at -80°C . Radiographs of the sacroiliac joints and the cervical and lumbar spine (lateral view) were taken at every visit. Radiological sacroiliitis was defined according to the modified New York criteria (van der Linden et al. 1984). MRI of the sacroiliac joints is performed at baseline to assess the presence of the active inflammatory lesions (bone marrow edema) according to the Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS)/Outcome Measures in Rheumatology (OMERACT) definition (Rudwaleit et al. 2009a).

Information related to the treatment established for each patient (DMARDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs [NSAIDs], biologic agents, and/or corticosteroids) is also recorded. The data were entered into an electronic database.

Of the 54 patients initially enrolled, 37 were diagnosed with SpA based on the rheumatologist's clinical judgment, 34 fulfilled the ASAS criteria for SpA (Rudwaleit et al. 2009b) and 13 the New York criteria for ankylosing spondylitis (van der Linden et al. 1984). After 2 years of follow-up, the 17 patients who did not satisfy the criteria for a diagnosis

of SpA were considered to have non-specific chronic low back pain (NLBP).

Measurement of Serum VIP Level

VIP levels were assessed using a commercially available competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe, Germany). Briefly, the serum samples were freeze-dried and dissolved in ELISA buffer (2:1), added to an immunoplate coated with a secondary antibody, and incubated with biotinylated VIP and a primary antibody whose Fab fragment was competitively bound by both biotinylated peptide and targeted peptide in samples. After washes, we added streptavidin-horseradish peroxidase to each well. During this incubation, the enzyme catalyzed the oxidation of the substrate solution. We terminated the enzymatic reaction using a stop solution and measured absorbance at 450 nm. A standard curve of known concentration was established. The concentration of VIP in the samples was determined by extrapolation to this standard curve and application of the corresponding dilution factor. Samples from each patient were assayed twice. The minimum detectable concentration was 0.12 ng/ml, with an intra-assay and interassay variation of ≤ 5 and 15 %, respectively. We previously reported that there was no significant correlation between VIP serum level and frozen time (Martinez et al. 2014).

Statistical Analysis

Normally distributed quantitative variables were represented as the mean \pm standard deviation (SD), while non-normally distributed variables were represented as the median and interquartile range (IQR). Variables with a normal distribution were analyzed using the *t* test; variables with a non-normal distribution were analyzed using the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test. Categorical variables were expressed as percentages and significance levels between groups were established using the χ^2 test or the Fisher exact test.

In order to better determine the association between heterogeneity in serum VIP levels and clinical variables, we fitted a population-averaged model by means of generalized linear models nested by patient and visit using the *xtgee* command of Stata 12 for Windows (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Since the raw variable serum VIP level did not show a Gaussian distribution, data were normalized through logarithmic transformation. Variables displaying a *p* value < 0.15 in the bivariate analysis were included in the multivariate analysis. Age and sex were included because previous studies had shown that these variables can act as confounders (Martinez et al. 2014). In addition, considering the interassay variability of ELISA, the model was also adjusted for the variations in assay plate VIP levels. Thereby, the final models were

constructed using the quasi-likelihood under the independence model information criterion and the Wald test (Pan 2001) after removing all variables with a *p* value above 0.15.

Results

Characteristics of Patients with Early SpA

The study population comprised 54 patients with either SpA ($n=37$) or NLBP ($n=17$). Table 1 shows the characteristics of the patients at baseline. The main differences between the two groups were that those diagnosed with SpA more often had a family history of SpA, HLA-B27 positivity, inflammation, structural damage in the sacroiliac MRI scan or radiographs, higher PCR levels, and lower levels of hemoglobin than patients with NLBP. However, no significant differences between these groups were detected for the functional indices, disease activity, or other laboratory variables (Table 1).

No significant differences were detected in serum VIP levels between SpA patients and NLBP patients at baseline ($p=0.36$) (Table 1). In addition, no relevant variation in VIP levels was observed during follow-up in either patient subset. We observed a non-significant trend toward increased VIP levels with age (data not shown), as we had reported previously in RA patients (Martinez et al. 2014). However, we did not observe significant differences by gender (data not shown), opposite to what we had observed in RA patients (Martinez et al. 2014).

Low Serum VIP Levels are Associated with Different Features of SpA

The BASDAI and BASFI scores were associated with serum VIP levels in the bivariate analysis, although only BASFI maintained this association in the multivariate analysis (Table 2). Patients with lower VIP levels had significantly higher BASFI scores (Fig. 1a), which indicate more severe disability. In addition, patients with inflammation on the MRI scan also had lower serum levels of VIP (Fig. 1b). This association was significant and independent in the multivariate analysis (Table 2). Furthermore, hemoglobin, which is associated with disease activity, was also significantly associated with serum VIP levels (Table 2 and Fig. 1c).

The presence of enthesitis or cutaneous psoriasis was also independently associated with lower serum VIP levels (Table 2, Fig. 2).

Only two patients in our study had inflammatory bowel disease; a non-significant trend toward lower levels of VIP was observed in both (data not shown). By contrast, patients who had experienced uveitis displayed significantly higher levels of VIP (Table 2).

Table 1 Baseline characteristics of patients with spondyloarthritis or chronic low back pain

	Spondyloarthritis (<i>n</i> =37)	Low back pain (<i>n</i> =17)	Total (<i>n</i> =54)	<i>p</i> value
Age* (years)	35.8±10.7	40.8±9.7	37.5±10.6	0.09
Gender** (female)	25 (67.6)	8 (47.1)	33 (61)	NS
Ethnicity** (Caucasian)	26 (70.3)	12 (70.6)	38 (70.4)	NS
Family history of SpA**	14 (37.8)	1 (5.9)	15 (27.8)	0.015
HLA-B27 (+)**	21 (56.7)	3 (17.7)	24 (44.4)	0.007
Enthesitis**	16 (43.2)	3 (17.7)	19 (35.2)	0.067
Arthritis**	11 (29.7)	1 (5.9)	12 (22.2)	0.05
Uveitis**	3 (8.1)	1 (5.9)	4 (7.4)	NS
Psoriasis**	4 (10.8)	1 (5.9)	5 (9.3)	NS
IBD **	2 (5.4)	0 (0.0)	2 (3.7)	NS
Previous infections**	3 (8.1)	0 (0.0)	3 (5.6)	NS
Sacroiliitis MRI**	22 (59.5)	0 (0.0)	22 (40.7)	<0.001
Sacroiliitis X-ray**	12 (33.3)	0 (0.0)	12 (22.2)	NS
BASDAI*	40.5±23.1	36.4±22.9	39.4±22.7	NS
BASFI***	29 [12–45]	25.5 [11–50]	26 [12–45]	NS
CRP (mg/dl) *	0.99±2.3	0.2±0.25	0.7±0.2	0.048
ESR (mm/h)*	23.3±18.8	15.6±13.0	21.0±17.5	0.082
ALP (U/l)*	62.8±19.4	67.2±18.2	64.2±18.9	NS
Hb (g/dl)*	13.2±2.4	14.6±1.3	13.6±2.2	0.023
VIP (pg/ml)***	250 [209–280]	292 [230–337]	251 [212–303]	NS

Data are shown as the mean±standard deviation (SD), frequency *n* (%), or median and [interquartile range]

IBD inflammatory bowel disease, MRI magnetic resonance imaging, BASDAI Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index, BASFI Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index, CRP C-reactive protein, ESR erythrocyte sedimentation rate, ALP alkaline phosphatase, Hb hemoglobin, VIP vasoactive intestinal peptide, NS non-significant

Statistical significance was established by * Student's *t* test, ** χ^2 or ***Kruskal-Wallis test for a *p* value <0.05

In order to determine how robust these results were, we also perform a multivariate analysis restricted to the SpA patients group. Most associations remain similar as those described herein (Table 3).

Table 2 Multivariate analysis of variables associated with VIP serum levels

	β Coeff.±SE	CI (95 %)	<i>p</i> value
Enthesitis	−0.104±0.058	−0.217 to 0.010	0.075
Uveitis	0.383±0.106	0.176 to 0.591	<0.001
Psoriasis	−0.227±0.094	−0.411 to −0.044	0.015
Sacroiliitis MRI	−0.150±0.057	−0.262 to −0.038	0.009
Biological therapy	0.184±0.118	−0.048 to 0.417	0.120
BASFI	−0.003±0.001	−0.005 to −0.001	0.003
Hb (g/dl)	0.031±0.012	0.006 to 0.055	0.014

Results of multivariate analysis performed with data from SpA patients and NLBP patients. Only variables with *p* value <0.15 in the respective bivariate analysis were included. Variables with *p* value <0.15, in the respective bivariate analysis, that were not included in the final model of the multivariate analysis are as follows: age, family history of SpA, HLA-B27(+), arthritis, CRP, and ESR

β Coeff. β coefficient of Wald test, SE standard error, CI confidence interval

Finally, only three patients required TNF blockers during follow-up, and we observed a non-significant trend toward higher levels of VIP after TNF blockade (data not shown). No significant association was observed with the prescription of DMARDs (sulfasalazine and methotrexate).

Discussion

We provide the first evidence of the association between low serum VIP levels and increased disease severity in patients with early SpA, namely, impaired functional status, bone edema in MRI, and a more intense inflammatory burden (anemia, psoriasis, IBD, and enthesitis). Our results provide additional support to in vitro and animal models by reinforcing the role of VIP as a major regulator of the immune system in autoimmune diseases (Gomariz et al. 2006; Gutierrez-Canas et al. 2008).

Although a previous study had described higher levels of serum VIP in ankylosing spondylitis patients compared to healthy donors (Nalbant et al. 2011), our results showed no differences between SpA and nonspecific low back pain patients. Possible explanations for this divergence are differences between both populations in gender distribution, race,

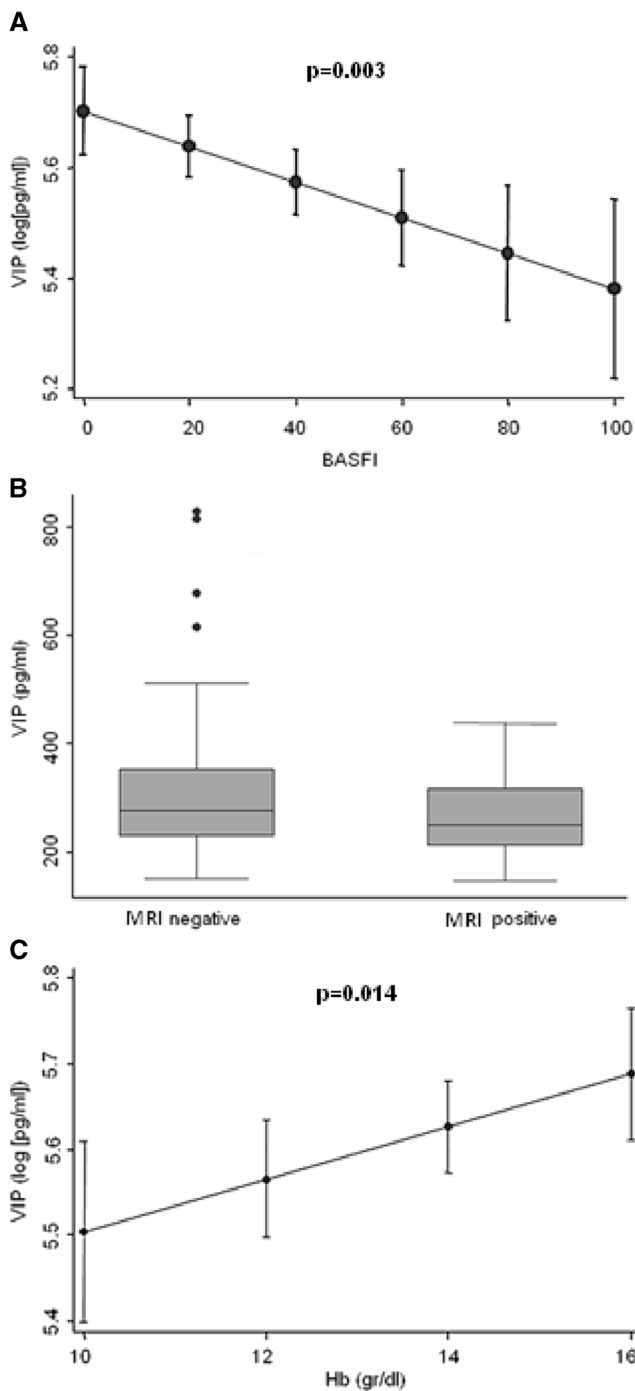


Fig. 1 Correlation between VIP serum levels during follow-up and clinical, radiological, and analytical variables. **a** Correlation between serum VIP levels during follow-up and the BASFI score. Data are shown as the mean value of VIP (normalized by logarithmic transformation) for each BASFI value adjusted for the other variables included in the multivariate analysis (solid dot). The figure also shows the 95 % confidence interval (lines above and below the dot). **b** Association between VIP levels and radiological variables. Distribution of VIP serum levels of the study cohort based on the presence or absence of lesions associated with spondylitis on MRI. Data are represented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p90 (line above the box) and p10 (line below the box) of the serum VIP levels. Dots represent outliers. This figure illustrates the association between VIP serum levels and MRI findings shown at Table 2 where statistical significance is reported. **c** Association between VIP levels and hemoglobin levels. Data are shown as the mean value of VIP (normalized by logarithmic transformation) for each value of hemoglobin (Hb) adjusted for the other variables included in the multivariate analysis (solid dot) and the 95 % confidence interval (lines above and below the dot). **a, b** The values were estimated using the *margins* command of Stata 12, following a multivariate analysis for longitudinal data nested by visit and patient using the *xtgee* command

One of the various unmet needs in SpA is the availability of reliable biomarkers both to distinguish inflammatory back pain from the more prevalent mechanical pain and to determine prognosis (Almodovar et al. 2014; de Vlam 2010). New ASAS diagnostic criteria and increased use of MRI have mitigated previous diagnostic limitations, although clinicians still need tools to predict disease activity and progression or to decide which patients would benefit from biologic therapies. In this context, measurement of serum VIP levels could be a useful tool for detecting a subpopulation with a greater functional and inflammatory burden.

Our results raise the question of why BASFI, instead of BASDAI, was associated with low VIP levels in the multivariate analysis. Each index correlated well with the other, especially in early disease, although they have the disadvantage of focusing only on the patient's perspective (Ward et al. 2013). Bearing in mind that other objective measures of disease activity such as MRI findings or hemoglobin levels were included in the multivariate analysis, it can be assumed that BASDAI did not provide additional information to the statistical model (Kiltz et al. 2012; Machado et al. 2012). In fact, it is well known that functional limitation at diagnosis is associated with a worse prognosis of SpA (Landewe et al. 2009). Therefore, the negative correlation between serum VIP levels and evolution of BASFI during follow-up is an interesting finding, since predicting long-term disability remains a challenge in patients with early SpA.

The association between low serum VIP levels and extra-articular features of SpA, such as psoriasis and enthesitis, further suggests the role of VIP as a biomarker of severity, since both impair quality of life and increase treatment requirements. In addition, VIP levels in the two patients with inflammatory low back pain and IBD were below the median VIP concentration in the whole population, although the difference

selection of controls, and early versus long-term disease stage. In addition, our findings are consistent with those of our previous observation that patients with early arthritis and low VIP serum levels have a more severe disease course (Martinez et al. 2014). Although variability in the VIP gene has not been reported as a genetic trigger of autoimmune disorders, several findings raise the possibility that once the disease has developed, low expression of VIP could lead to poorer outcome (Jiang et al. 2012; Martinez et al. 2014).

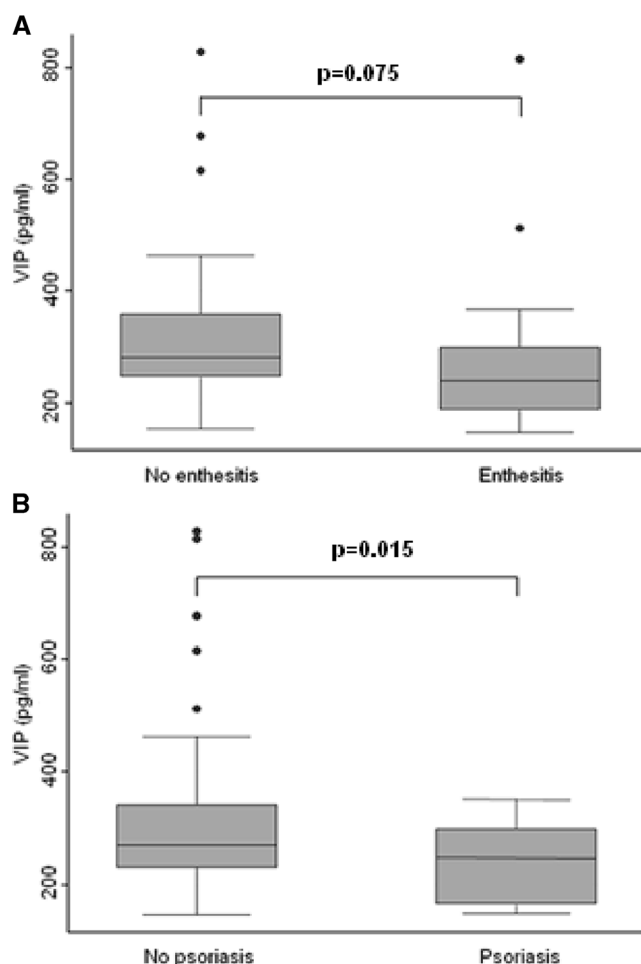


Fig. 2 Decreased VIP serum levels are associated with clinical manifestations of enthesitis (**a**) and psoriasis (**b**). The figure illustrates the association between VIP serum levels and these clinical manifestations shown at Table 2 where statistical significance is reported. Data are represented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p90 (line above the box) and p10 (line below the box) of serum VIP levels. Dots represent outliers

was not statistically significant. Conversely, we found that the correlation between VIP and uveitis contrasted with the expected trend. Nevertheless, among patients with uveitis, the patient with the highest VIP levels did not fulfill the criteria for SpA. When this patient was excluded, serum VIP levels in patients with uveitis did not exceed the median concentration in the whole population.

Drug therapy for controlling axial inflammation after failure of NSAIDs remains almost restricted to TNF blockers (van der Heijde et al. 2011); the role of DMARDs in severe peripheral forms is limited. Consequently, in recent years, one of the main objectives in the treatment of SpA has been to identify patients with an optimal safety profile and cost-benefit ratio for TNF antagonists. An interesting result in our study was that treatment with anti-TNF agents seemed to increase serum VIP levels. This effect did not reach statistical

Table 3 Multivariate analysis of variables associated with VIP serum levels in patients diagnosed from spondyloarthritis

	β Coeff. \pm SE	CI (95 %)	<i>p</i> value
Enthesitis	-0.133 ± 0.057	-0.245 to 0.020	0.020
Uveitis	0.165 ± 0.112	-0.054 to 0.385	0.140
Psoriasis	-0.203 ± 0.094	-0.388 to -0.018	0.032
Sacroiliitis MRI	-0.173 ± 0.058	-0.286 to -0.059	0.003
Biological therapy	0.175 ± 0.123	-0.066 to 0.416	0.150
BASFI	-0.003 ± 0.001	-0.006 to -0.001	0.017
Hb (g/dl)	0.023 ± 0.013	0.003 to 0.049	0.081

Results of multivariate analysis performed with data from SpA patients. Only variables with *p* value <0.15 in the respective bivariate analysis were included. Variables with *p* value <0.15 , in the respective bivariate analysis, that were not included in the final model of the multivariate analysis are as follows: age, family history of SpA, HLA-B27(+), arthritis, CRP, and ESR

β Coeff. β coefficient of Wald test, SE standard error, CI confidence interval

significance, probably owing to the small number of patients requiring this treatment. However, it is noteworthy that we previously reported the same effect of TNF blockade on serum VIP levels in patients with RA: the increase was statistically significant, probably because of the higher number of patients treated with TNF blockers (Martinez et al. 2014). Several features point to serum VIP levels as a putative marker of the need to prescribe TNF blockers, as follows: (a) high BASFI scores and the presence of enthesitis have been identified as predictors of response to therapy with these drugs (Vastesaeger et al. 2011); (b) anemia is associated with inflammatory activity in SpA, and improvements in hemoglobin levels have been reported after anti-TNF treatment (Furst et al. 2013; Niccoli et al. 2012); (c) low serum VIP levels have been associated with high BASFI scores and the presence of enthesitis and anemia; and (d) administration of TNF blockers increases serum VIP levels. Furthermore, it would be of particular interest to determine whether the increase in serum VIP levels reported with TNF blockers is class-specific or is also observed in autoimmune disorders treated with other biological therapies, such as blockade of interleukin (IL)-6 or IL-12 signaling.

Our study is subject to a series of limitations. First, the sample is small, although the longitudinal design did enable us to evaluate a considerable number of observations and to better control individual variations. Second, we were unable to detect differences in VIP levels between patients with SpA and those with NLBP, even when the first visit was analyzed separately (data not shown). In addition, we have used a mixed population of patients that were finally diagnosed from SpA and others with NLBP. However, when patients with suspicion of SpA are attended for the first time at the clinic this is the challenge and establishing early a prognosis may be

helpful despite a definite diagnosis has not been done. Nevertheless, our results were similar when analyzing the whole population or only those patients with SpA diagnosis.

In summary, validated biomarkers of the severity of SpA are scarce and insufficient to properly identify and classify early SpA patients according to their treatment requirements and prognosis. Consequently, new validated biomarkers are needed to achieve these goals. In this framework, the main finding of our study is that patients with early inflammatory low back pain and low serum VIP levels experience a higher inflammatory burden and worse functional outcome during the first 2 years of their disease course.

Acknowledgments The authors are grateful to the patients from the early Chronic Inflammatory Back Pain (CIBP) at Hospital Universitario La Princesa. This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI11/00195, PI11/00505, PI12/00758, RETICS RD12/0009/0002 and RD12/0009/0017 and PIE13/0051) within VI PNDE I+D+I 2008/2011 and by FEDER funds, from UCM-BSCH, and S2010/BMD-2350 from Comunidad de Madrid.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Abad C, Martinez C, Juarranz MG et al (2003) Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124:961–971
- Almodovar R, Rios V, Ocana S et al (2014) Association of biomarkers of inflammation, cartilage and bone turnover with gender, disease activity, radiological damage and sacroiliitis by magnetic resonance imaging in patients with early spondyloarthritis. *Clin Rheumatol* 33:237–241
- Bennett AN, Rehman A, Hensor EM, Marzo-Ortega H, Emery P, McGonagle D (2009) Evaluation of the diagnostic utility of spinal magnetic resonance imaging in axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 60:1331–1341
- Braun J, Pincus T (2002) Mortality, course of disease and prognosis of patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 20:S16–22
- Calin A, Garrett S, Whitelock H et al (1994) A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol* 21:2281–2285
- Carmona L, Ballina J, Gabriel R, Laffon A (2001) The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis* 60:1040–1045
- Carrion M, Juarranz Y, Perez-Garcia S et al (2011) RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum* 63:1626–1636
- Carrion M, Juarranz Y, Seoane IV et al (2014) VIP modulates IL-22R1 expression and prevents the contribution of rheumatoid synovial fibroblasts to IL-22-mediated joint destruction. *J Mol Neurosci* 52:10–17
- Colbert RA, DeLay ML, Klenk EI, Layh-Schmitt G (2010) From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunol Rev* 233:181–202
- Chung HY, Machado P, van der Heijde D, D'Agostino MA, Dougados M (2012) Smokers in early axial spondyloarthritis have earlier disease onset, more disease activity, inflammation and damage, and poorer function and health-related quality of life: results from the DESIR cohort. *Ann Rheum Dis* 71:809–816
- de Vlam K (2010) Soluble and tissue biomarkers in ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24:671–682
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP (2001) Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 7:563–568
- Deyo RA, Weinstein JN (2001) Low back pain. *N Engl J Med* 344:363–370
- Dougados M, Baeten D (2011) Spondyloarthritis. *Lancet* 377:2127–2137
- Fabreguet I, Koumakis E, Burki V et al (2012) Assessment of work instability in spondyloarthritis: a cross-sectional study using the ankylosing spondylitis work instability scale. *Rheumatology (Oxford)* 51:333–337
- Furst DE, Kay J, Wasko MC et al (2013) The effect of golimumab on haemoglobin levels in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 52:1845–1855
- Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A (1994) A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 21:2286–2291
- Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C (2006) VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1070:51–74
- Gutierrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B et al (2006) VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 45:527–532
- Gutierrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B et al (2008) Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 22:312–317
- Jiang W, Gao SG, Chen XG et al (2012) Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: a new indicator of disease severity? *Clin Biochem* 45:1607–1612
- Jimeno R, Gomariz RP, Gutierrez-Canas I, Martinez C, Juarranz Y, Leceta J (2010) New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol* 88:734–745
- Juarranz Y, Abad C, Martinez C et al (2005) Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:R1034–1045
- Kiltz U, Baraliakos X, Karakostas P et al (2012) The degree of spinal inflammation is similar in patients with axial spondyloarthritis who report high or low levels of disease activity: a cohort study. *Ann Rheum Dis* 71:1207–1211
- Landewe R, Dougados M, Mielants H, van der Tempel H, van der Heijde D (2009) Physical function in ankylosing spondylitis is independently determined by both disease activity and radiographic damage of the spine. *Ann Rheum Dis* 68:863–867
- Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Carrion M, Arranz A, Juarranz Y (2007) Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation* 14:134–138
- Li H, Mei Y, Wang Y, Xu L (2006) Vasoactive intestinal polypeptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses. *J Clin Immunol* 26:430–437

- Lodde BM, Mineshiba F, Wang J et al (2006) Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 65:195–200
- Machado MADA, Barbosa MM, Almeida AM et al (2013) Treatment of ankylosing spondylitis with TNF blockers: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 33:2199–2213
- Machado P, Landewe RB, Braun J et al (2012) MRI inflammation and its relation with measures of clinical disease activity and different treatment responses in patients with ankylosing spondylitis treated with a tumour necrosis factor inhibitor. *Ann Rheum Dis* 71:2002–2005
- Martinez C, Ortiz AM, Juarraz Y et al (2014) Serum levels of vasoactive intestinal Peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS One* 9:e85248
- Marzo-Ortega H, Emery P, McGonagle D (2002) The concept of disease modification in spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 29:1583–1585
- Marzo-Ortega H, McGonagle D, O'Connor P et al (2009) Baseline and 1-year magnetic resonance imaging of the sacroiliac joint and lumbar spine in very early inflammatory back pain. Relationship between symptoms, HLA-B27 and disease extent and persistence. *Ann Rheum Dis* 68:1721–1727
- McGonagle D, Thomas RC, Schett G (2014) Spondyloarthritis: may the force be with you? *Ann Rheum Dis* 73:321–323
- Nalbant S, Cagiltay E, Sahan B, Terekeci HM, Oktenli C (2011) The vasoactive intestinal polypeptide (VIP) levels at the patients with ankylosing spondylitis and its association with inflammation markers. *Rheumatol Int* 31:1143–1146
- Niccoli L, Nannini C, Cassara E, Kaloudi O, Cantini F (2012) Frequency of anemia of inflammation in patients with ankylosing spondylitis requiring anti-TNFalpha drugs and therapy-induced changes. *Int J Rheum Dis* 15:56–61
- Pan W (2001) Model selection in estimating equations. *Biometrics* 57: 529–534
- Poddubnyy D, Haibel H, Listing J et al (2012) Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 64:1388–1398
- Rudwaleit M, Jurik AG, Hermann KG et al (2009a) Defining active sacroiliitis on magnetic resonance imaging (MRI) for classification of axial spondyloarthritis: a consensual approach by the ASAS/OMERACT MRI group. *Ann Rheum Dis* 68:1520–1527
- Rudwaleit M, Khan MA, Sieper J (2005) The challenge of diagnosis and classification in early ankylosing spondylitis: do we need new criteria? *Arthritis Rheum* 52:1000–1008
- Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R et al (2009b) The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 68:777–783
- van der Heijde D, Sieper J, Maksymowych WP et al (2011) 2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 70: 905–908
- van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A (1984) Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 27:361–368
- Vastesaeger N, van der Heijde D, Inman RD et al (2011) Predicting the outcome of ankylosing spondylitis therapy. *Ann Rheum Dis* 70: 973–981
- Ward MM, Learch TJ, Gensler LS, Davis JC Jr, Reveille JD, Weisman MH (2013) Regional radiographic damage and functional limitations in patients with ankylosing spondylitis: differences in early and late disease. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 65:257–265

Artículo 3

Vasoactive Intestinal Peptide Gene Polymorphisms, associated with its Serum Levels, Predict Treatment Requirements in Early Rheumatoid Arthritis.

Seoane IV, Martínez C, García-Vicuña R, Ortiz AM, Juarranz Y, Talayero VC, González-Álvaro I, Gomariz RP, Lamana A (en revisión en *Scientific Reports*)

Vasoactive Intestinal Peptide Gene Polymorphisms, Associated with its Serum Levels, Predict Treatment Requirements in Early Rheumatoid Arthritis

Iria V. Seoane¹, Carmen Martínez², Rosario García-Vicuña³, Ana María Ortíz³, Yasmina Juarranz¹, Vanessa C. Talayero³, Isidoro González-Álvaro³, Rosa P. Gomariz^{1,+} & Amalia Lamana^{3,+}

We had previously reported that early arthritis (EA) patients with low VIP serum levels suffer a worse clinical course of the disease. Here we analyze whether variants in *VIP* gene correlate with its serum levels and clinical parameters in EA. *VIP* gene was sequenced in patients with extreme high/low VIP levels, measured by enzyme immunoassay. Sixteen single nucleotide polymorphisms (SNPs) were differentially distributed between both groups and were genotyped in two sets of patients. We found that patients with CC genotype of rs688136 displayed higher VIP levels both in discovery (n=91; p=0.033) and validation populations (n=131; p=0.007). This effect was attenuated by the presence of minor alleles of rs35643203 and rs12201140, which had a clear trend towards low VIP levels association (p=0.118 and p=0.049 respectively). Functional studies with miR-205-5p, which target site at 3'UTR is close to rs688136, revealed a miRNA-mediated regulatory mechanism explaining the higher *VIP* gene expression in homozygous patients. Moreover, patients with rs688136 CC genotype and no minor alleles of the other polymorphisms required less treatment (p=0.009). We concluded that, the identification of polymorphisms associated to VIP serum levels would complement the clinical assessment of the severity in rheumatoid arthritis patients.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, polygenic and immune-mediated inflammatory disease that if not treated, leads to significant joint damage, pain, and disability¹.

¹Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 28040, Spain. ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 28040, Spain. ³Servicio de Reumatología, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, 28006, Madrid, Spain. ⁺Amalia Lamana and Rosa P. Gomariz shared senior authorship. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.P.G. (e-mail: gomariz@bio.ucm.es)

The pathogenesis of RA is not completely elucidated but genetic factors account for approximately 60% on disease susceptibility² and interact with environmental factors such as tobacco and diet for triggering the development of the disease³⁻⁵.

RA affects 0.5-1% of the adult population worldwide originating significant social costs in terms of disability, increased comorbidity, impaired quality of life and decreased life expectancy^{6,7}.

According to the “window of opportunity” concept, aggressive disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) treatment from the earliest stages of the disease can prevent irreversible structural damage and even increase the possibility to achieve DMARD-free remission^{8,9}. Heterogeneity in disease course is well known in RA, so treating all patients with aggressive DMARD schedules could be unacceptable in some cases in which the risk of adverse events could overpass the benefits. Available biomarkers of severity such as rheumatoid factor or anti-citrullinated peptide antibodies (ACPA) do not identify accurately all patients requiring more intensive treatment¹⁰. Thus, the search for new prognosis biomarkers represents an important challenge in the management of RA in order to establish an intensive and appropriate treatment at the beginning of the disease, trying to change the disease course in those patients with expected worse prognosis. Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) is a homeostatic and immunoregulatory peptide involved in the control of both innate and adaptive immune response. Exogenous administration of VIP exerted therapeutic effects in models of autoimmune/inflammatory disorders, including inflammatory bowel disease¹¹, experimental autoimmune encephalomyelitis¹², Sjögren’s syndrome¹³, and autoimmune diabetes¹⁴, as well as in a murine model of collagen-induced arthritis¹⁵. In humans, VIP exerts its protective effects by inhibiting the macrophage pro-inflammatory polarization profile¹⁶, changing the Th1/Th2 balance in CD4 T cell differentiation in favour of Th2 cells¹⁷, promoting the acquisition of Th17 non-pathogenic profile¹⁸ and inducing regulatory T cells¹⁸⁻²⁰.

The immunoregulatory function of endogenous VIP is supported by the fact that several inflammatory/autoimmune diseases are associated with reduced levels of VIP in serum²¹. In this regard, we have recently reported that patients with Early Arthritis (EA) and early Spondyloarthritis (SpA), who displayed low VIP serum levels at disease onset seem to develop higher burden of disease^{22,23}. However, using VIP serum levels as a viable biomarker in daily clinical practice presents methodological problems such as the inter-assay variability of the enzyme immunoassay (EIA) method²². Therefore, we studied here whether variations in DNA sequence of *VIP* gene may associate with VIP expression and whether they could reproduce the prognostic value previously described for VIP serum levels. Furthermore, we propose a possible functional mechanism to explain the contribution of one of these genetic variants in *VIP* gene to its serum levels.

Results

Patient characteristics and sequencing of *VIP* gene.

The characteristics of the EA patients subpopulations included in the present study (91 patients for the discovery phase and 131 for the validation phase) are shown in Table 1.

We selected 20 patients from the discovery population, which displayed extreme baseline serum VIP levels, for the sequencing screening of *VIP* gene. The characteristic of this subset of patients are shown in Supplementary Table 1. Sequences and length of the primers used for sequencing experiments are detailed in Supplementary Table 2.

	Discovery population (n=91)	Validation population (n=131)	<i>p</i>	Meta-analysis (n=222)
Female gender (%)	64 (70)	108 (82)	0.08	172 (77)
Age	54 [44-66]	54 [44-67]	0.88	54 [44-66]
Diagnosis RA / UA (%)	69 (76) / 22 (24)	92 (70) / 39 (30)	0.45	161 (73) / 61 (27)
Positive RF (%)	38 (42)	73 (56)	0.04	111 (50)
Positive ACPA (%)	42 (46)	70 (53)	0.32	112 (50)
Ever smoker (%)	47 (52)	68 (52)	0.89	115 (48)
DAS28 (0-10)	4.8 [3.5-5.9]	4.1 [3.4-5.5]	0.16	4.5 [3.4-5.7]
HUPI	7.5 [6-10]	6.5 [4.5-10]	0.09	7 [5-10]
HAQ	1 [0.625-1.625]	0.875 [0.375-1.625]	0.29	1 [0.5-1.625]
VIP (pg/ml)	456 [383-501]	529 [460-595]	0.63	453 [384-519]

Table 1. Baseline characteristics of PEARL subpopulations. Data are shown as the median and the interquartile range or as the percentage. RA: rheumatoid arthritis; UA: undifferentiated arthritis; RF: rheumatoid factor; ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies; DAS28: 28-joint count Disease Activity Score; HUPI: Hospital Universitario La Princesa Index for disease activity; HAQ: health assessment questionnaire; VIP: vasoactive intestinal peptide. Statistical significance was established by t test or Mann-Whitney test for a p-value < 0.05.

EA patients with high or low serum VIP levels show different genetic variants in *VIP* gene.

High-quality sequencing data were obtained for 20 patients composing the screening set. After comparing their *VIP* sequences with the consensus sequence²⁴ we found 120 variants, most of which were distributed randomly between the 2 subsets. Among those variants, we observed 16 SNPs differentially distributed in both groups (Figure 1A and Supplementary Table 3). Next we genotyped those 16 variants in two different sets of EA patients by sequencing or using SNP TaqMan probes as it was explained in Methods section. Genotyping of PEARL samples showed that the following five SNPs had a minor

allele frequency (MAF) of <5% in our population and therefore they were excluded from statistical analysis: rs60946248, rs140023105, rs185451870, rs74760293, and rs149081483 (number of cases and MAF showed in Supplementary Table 3).

Then, we studied whether the rest of SNPs were in linkage disequilibrium (LD). The R^2 value was >0.9 for rs12213214, rs3799142, rs7764067 and rs12201173. We chose rs12213214 as tagSNP for this group since that polymorphism is located in the promoter

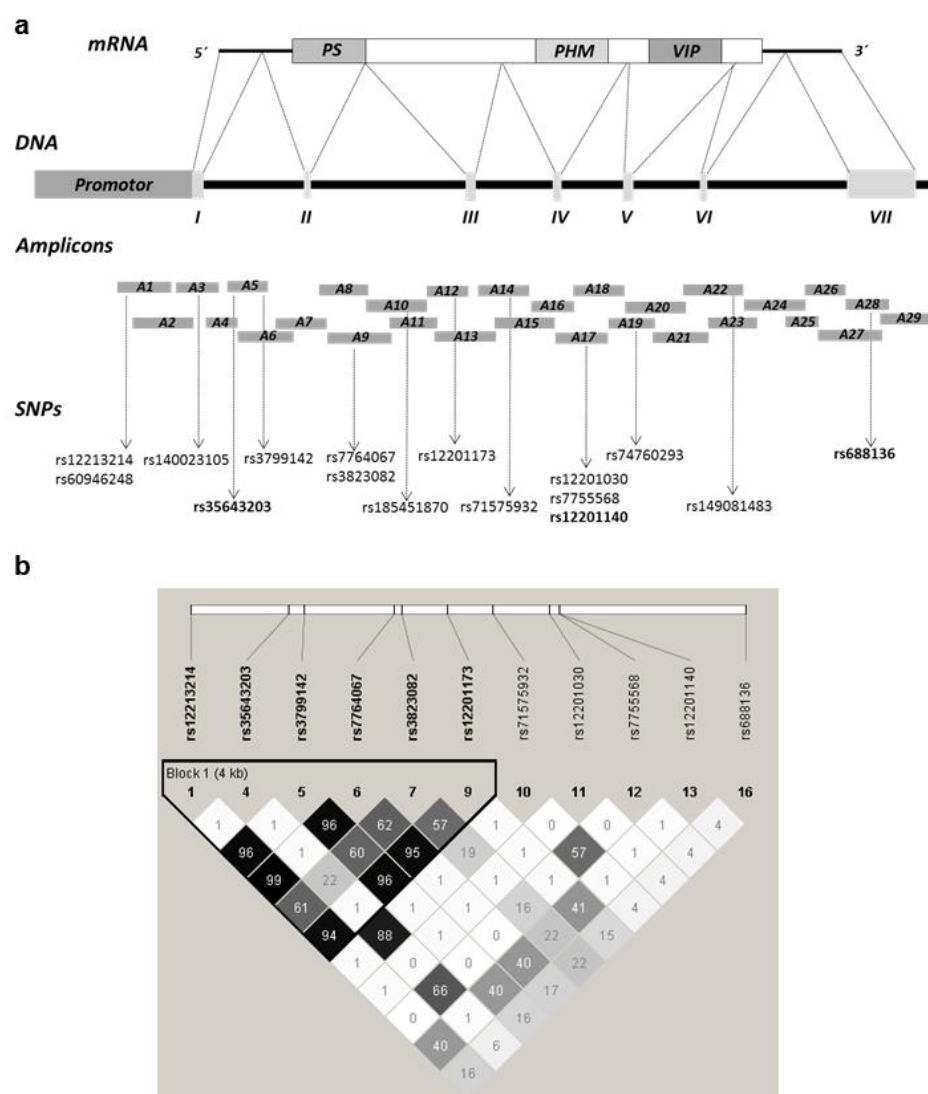


Figure 1. Sequencing of VIP gene and Linkage Disequilibrium (LD) Plot. (a) Structural diagram of VIP gene comprising the promoter region, 7 exons and 6 introns. The upper diagram shows mRNA transcription and the bottom diagram represents the 29 overlapping amplicons used for sequencing, as well as the SNPs found. SNPs chosen for further study are highlighted in bold. (b) Plot showing LD patterns among genotyped SNPs. LD is measured as r^2 and shown ($\times 100$) in the diamond at the intersection of diagonals from each SNP. $r^2 = 0$ shown in white, $0 < r^2 < 1$ shown in grey and $r^2 = 1$ shown in black. Top analysis track represents chromosomal location. Bold black line outlines one haplotype block designating markers in high LD.

region. In addition, rs3823082 showed an $R^2=0.614$ with rs12213214. As shown in Figure 1B, applying the Gabriel method²⁵, we observed that these five SNPs formed a haplotype block. On the other hand, rs35643203 and rs71575932 were in LD ($R^2=0.88$) and we chose rs35643203 as tagSNP. The remaining polymorphisms were studied separately since they were not in LD with any other.

Genetic variants in the VIP gene influence serum levels of VIP in EA patients in a Discovery Phase.

Next, to assess the relationship between VIP levels and selected polymorphisms on *VIP* gene, we performed a preliminary bivariate analysis. As it is shown in Supplementary Table 4, in the discovery population those patients with one minor allele of rs35643203 had significantly lower serum VIP levels than homozygous patients for the major allele. In addition, patients carrying one minor allele of rs3823082 and rs7755568 showed a non-significant trend to lower VIP levels than those with two doses of the mayor allele. On the other hand, the only SNP that seemed to be related with increased VIP levels was rs688136. For this reason we decided to include it in the validation study.

Since in previous studies we have observed that several variables, namely age at disease onset and use of TNF-blocking agents, may have an influence in VIP levels^{22,23}, we decided to perform a multivariable analysis to further elucidate the contribution of these SNPs to serum VIP levels.

We found that patients with one minor allele of rs35643203 had significant lower serum VIP levels than homozygous patients for the major allele ($p=0.05$) and detected a similar trend for rs12201140 ($p=0.068$) (Supplementary Table 5). Interestingly, we discovered that the CC genotype of the rs688136 was significantly associated with higher levels of serum VIP ($p=0.033$).

Validation Phase and Meta-analysis.

With the aim of confirming the association between SNPs of *VIP* gene and VIP serum levels observed in the discovery population, we replicated the analyses in a new set of 131 patients. The association of CC genotype for rs688136 with higher VIP levels was confirmed both in the bivariate analysis ($p=0.002$) (Supplementary Table 4) and the multivariate analysis ($p=0.007$) (Supplementary Table 5 model 1).

In a further step, the meta-analysis of both populations ($n=222$) performed for the rs688136, showed that the association between CC genotype and high VIP levels remained statistically significant, both in the bivariate ($p=0.008$) and multivariate analysis ($p=0.004$) (Figure 2A, Table 2 model 1 and Supplementary Table 5). By means of this multivariate analysis we also confirmed a significant association between serum VIP levels and rs12201140 in the meta-analysis ($p=0.049$) (Figure 2B and Table 2 model 1) and a non-significant trend for the rs35643203 ($p=0.118$) (Figure 2C and Table 2 model 1).

	Model 1		Model 2	
	β coeff \pm SE	p	β coeff \pm SE	p
rs688136				
TT	Ref.		-	-
TC	-1 \pm 16.1	0.929		
CC	79 \pm 27.9	0.004		
rs35643203				
CC	Ref.		-	-
CT	-38 \pm 24.1	0.118		
TT	16 \pm 81.3	0.845		
rs12201140				
AA	Ref.		-	-
AT	-35 \pm 17.6	0.049		
TT	-100 \pm 71.3	0.162		
Interaction Score				
CT or TT and no other minor alleles	-	-	Ref.	
CT or TT and other minor alleles			-37 \pm 14.1	0.009
CC and no other minor alleles			99 \pm 36.3	0.006
CC and other minor alleles			12 \pm 27.8	0.669
Onset Age				
<45	Ref.		Ref.	
45 - 65	31 \pm 18.4	0.090	31 \pm 16.2	0.052
> 65	27 \pm 20.3	0.179	33 \pm 17.7	0.065
TNF blockers				
No	Ref.		Ref.	
Yes	73 \pm 34.1	0.031	65 \pm 30.8	0.036

Table 2. Polymorphisms associated to VIP serum levels during the follow-up of patients with early arthritis in a multivariate analysis. The longitudinal analysis was performed with data from consecutive visits corresponding to the meta-analysis (n=222). Included patients had, at least, two visits along the follow-up. Signification was established by means of generalized estimating equations nested by patient and visit. Multivariable model fitted by a backward-stepwise selection. Model 1 fitted including independent polymorphisms and Model 2 including the Interaction Score. Ref.: reference value; β coeff: beta coefficient; SE: standard error; TNF: tumor necrosis factor.

Interactions between polymorphisms in VIP gene could modify VIP serum levels.

Since we observed a marked heterogeneity in VIP serum levels among genotypes of each SNP, we investigated if interactions between the genetic variants of *VIP* gene could explain this variability. Thus, we created an Interaction Score as a categorical variable that let us cluster the patients in 4 groups according to the genotype of rs688136 (CC vs. CT/TT) and the absence/presence of minor alleles of rs35643203 and/or rs12201140. We consider as the population of reference the one that presents the minimum variations with respect to the consensus sequence in relation to the genetic variants of study, that is, the population of patients with CT or TT genotype of rs688136 and no minor alleles of the other polymorphisms. As shown in figure 2D, patients with CC genotype of rs688136

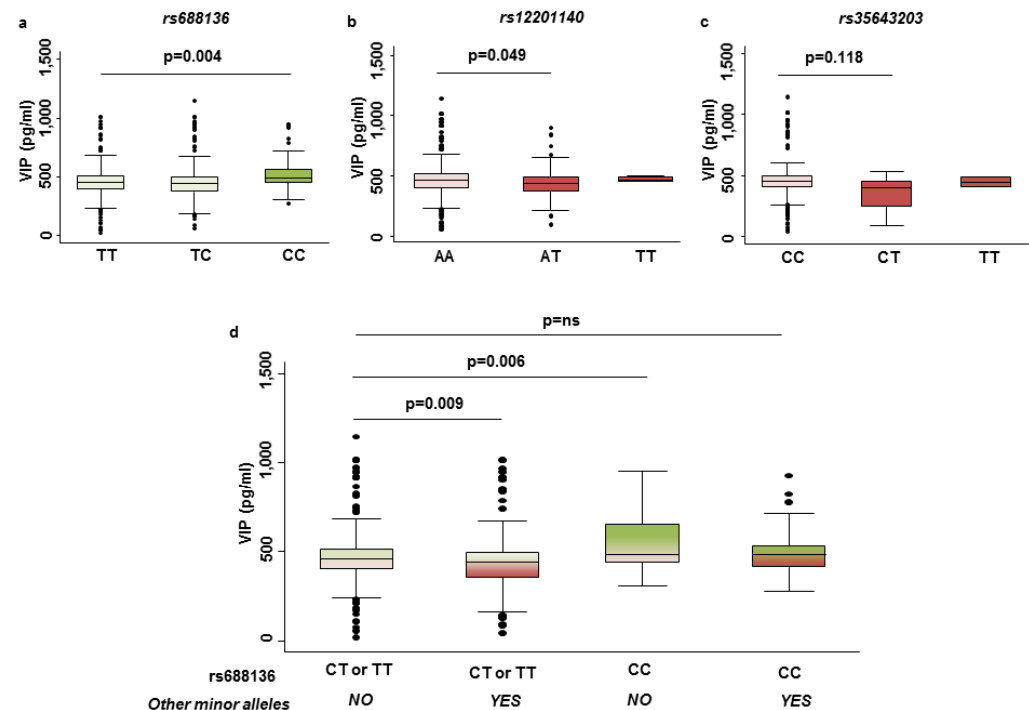


Figure 2. Serum VIP levels in EA patients according to different genotypes. Serum VIP levels according to the genotype of the: (a) rs688136; (b) rs12201140; (c) rs35643203. (d) Interaction Score for different genotype combinations of VIP gene polymorphisms associated to VIP serum levels. In all panels data from the meta-analysis (n=222) are presented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 bottom edge, and p50 midline), p90 and p10 (lines below and above the box) of the serum VIP levels. Statistical significance for a p-value<0.05 was established by means of a multivariate analysis adjusted by age of onset and TNF α blockers and nested by patient and visit. Dots represent outliers. n.s.: non-significant.

and no minor alleles of the other SNPs showed the highest VIP serum levels ($p=0.006$). The group with the lowest levels was the one who had, at least, one major allele of rs688136 and, at least, one minor allele of the other SNPs (Fig 2D, Table 2 model 2). Interestingly, those patients carrying the CC genotype of rs688136 (associated with high VIP levels) and at least, one minor allele of rs35643203 or rs12201140 (associated with low VIP levels) displayed similar VIP levels to the reference population (Figure 2D and Table 2 model 2).

The minor allele of rs688136 interferes with downregulation of VIP expression induced by miR-205-5p.

Next, we tried to elucidate the mechanism involved in the differences on VIP serum levels associated to the presence of T/C allele of the rs688136. Since this polymorphism is located at 3'UTR that plays a role in the regulation of most mRNA expression, PsiCheck-2 vector was constructed as explained in Methods section. A Dual Luciferase Assay was performed in order to analyze if the mere presence of the T allele was associated to a minor luciferase activity and, thus, to a reduced gene expression. As it is shown in figure 3A, we did not observe statistically significant differences between the luciferase activities of both vector constructs, but there is a trend towards a decreased expression in presence of the T allele.

As miRNA binding sites have been described as one of the regulatory mechanisms in 3'UTR, we searched in Target Scan (www.targetscan.org) and miRBase (www.mirbase.org) for miRNAs with predicted binding site close to the SNP rs688136 and found the has-miR-205-5p (Figure 3B). Thus, we co-transfected Jurkat cells with the PsiCheck-2 vectors (T-insert or C-insert), and this miRNA. Another co-transfection with the mimic cel-miR-39-3p was performed as a control miRNA experiment. The result of the Dual Luciferase Assay showed that in presence of miR205-5p, cells co-transfected with the T-insert vector displayed a significant decreased gene expression in terms of lower luciferase activity, whereas the vector with the C allele of rs688136 was resistant to the regulatory effect of miR-205-5p (Figure 3C; $p=0.049$).

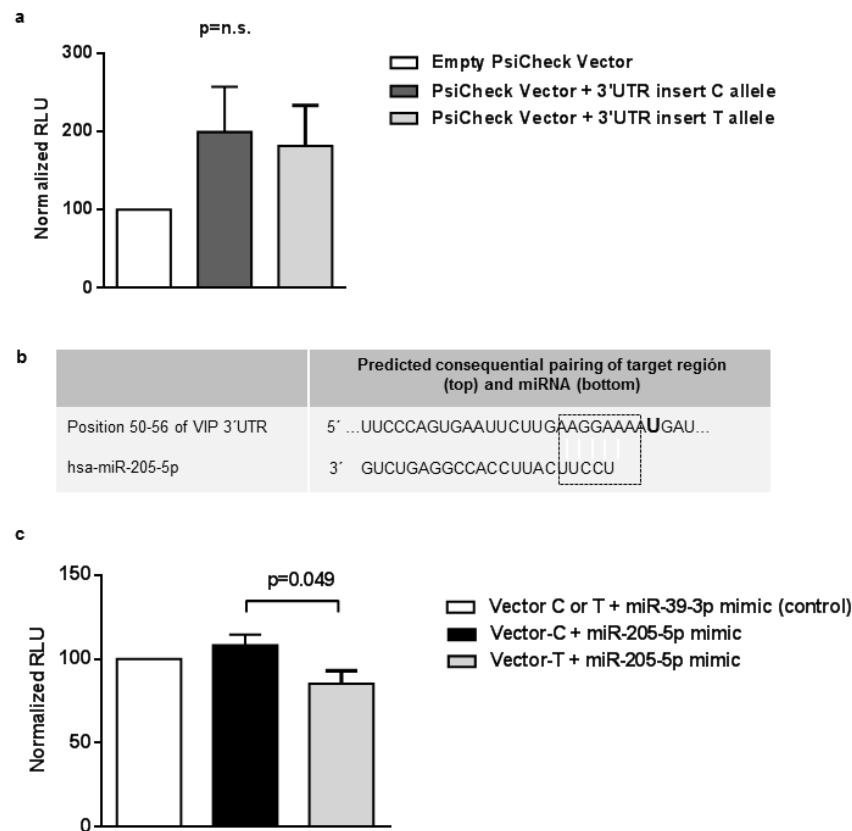


Figure 3. VIP 3'UTR as a target of miRNA miR-205-5p. (a) Transfection with empty PsiCheck2 vector and PsiCheck2 vector-3'UTR inserts with T or C allele for the rs688136 respectively. Data are represented as the mean \pm SEM. n=10 each group. n.s.: non-significant. (b) Bioinformatic prediction of hsa-miR-205-5p recognition elements on human VIP 3'UTR. Analyses performed with the TargetScanHuman algorithm. Letter U highlighted in bold corresponds to rs688136 position. Dotted box indicates pairing region. (c) Co-transfection with PsiCheck2 vector-3'UTR inserts with T or C allele and mimic miRNAs miR-205-5p and miR-39-3p (control). Data are represented as the mean \pm SEM. n=8 each group. RLU: relative luminescence unit. Statistical significance in panels a and c was established using Mann-Whitney test for a p-value<0.05. Each experiment was made in duplicate.

Combinations of genetic variants of *VIP* gene are associated with treatment requirements in EA patients.

Finally, as we have previously reported that low serum VIP levels are associated with poor outcomes in EA patients²², we investigated whether genetic variants of *VIP* associated with its protein levels are also associated with the intensity of DMARD treatment as surrogate variable of RA severity. After adjustment by gender, age of disease onset, final diagnostic, presence of ACPA antibodies and the physician who prescribed the medication, we studied the relation between the *Interaction Score* and the variable Intensity of Treatment (see Methods) after 2 years of follow-up. The meta-analysis of

both, discovery and validation populations, demonstrated that there was a significant correlation between the combinations of different alleles associated to higher and lower VIP serum levels and the Intensity of Treatment (Table 3 and Supplementary Table 6). Specifically, we found that patients with CC genotype of rs688136 and no other minor alleles of rs35643203 and/or rs12201140 required less intensive treatment than those who had the CC genotype plus at least one of the minor alleles associated to lower VIP levels ($p=0.009$).

	β coeff \pm SE	<i>p</i>
Interaction Score		
CT or TT and no other minor alleles	Ref.	
CT or TT and other minor alleles	-0.14 \pm 0.09	0.131
CC and no other minor alleles	-0.62 \pm 0.24	0.009
CC and other minor alleles	-0.04 \pm 0.19	0.849
Gender		
Male	Ref.	
Female	0.15 \pm 0.11	0.174
Onset Age		
< 45	Ref.	
45 - 65	-0.01 \pm 0.11	0.958
> 65	-0.11 \pm 0.12	0.363
Diagnosis		
RA	Ref.	
UA	-0.85 \pm 0.11	0.000
ACPA		
Negative	Ref.	
Positive	0.12 \pm 0.10	0.226
Physician		
0	Ref.	
1	0.09 \pm 0.18	0.660
2	0.69 \pm 0.14	0.000
3	-0.41 \pm 0.24	0.119
4	0.06 \pm 0.14	0.621
5	0.31 \pm 0.16	0.042
6	0.32 \pm 0.13	0.007

Table 3. Association of genotype combinations of the Interaction Score with the Intensity of Treatment in patients with early arthritis. Multivariable analysis. Association analysis performed with data corresponding to the meta-analysis ($n=222$). Signification was established by means of generalized estimating equations. Multivariable model fitted by a backward-stepwise selection. Ref.: reference value; β coeff: beta coefficient; SE: standard error.

Discussion

Studies on genetic variants influencing the risk of developing autoimmune diseases are numerous²⁶. However, there are few reports on how genetic variability can modulate the severity of autoimmune disorders. This latter approach may be particularly useful when designing the optimal treatment for patients with autoimmune diseases. In this regard, as far as we know, this study is the first to demonstrate that several polymorphisms of the *VIP* gene are associated with differences in serum levels in patients with early arthritis. Considering that low serum VIP levels have been associated with worse disease course and greater treatment needs²², the SNPs of *VIP* identified herein and associated with its serum levels could be potential indicators of treatment requirements and therefore, disease severity, in patients with recent onset.

VIP is an endogenous mediator involved in the maintenance of homeostasis of the endocrine, nervous, and immune systems²⁷⁻²⁹. Administration of exogenous VIP improved clinical outcome in several experimental inflammatory/autoimmune murine models^{11-15,30}. Moreover, *ex vivo* assays with synovial fibroblasts (SF) and peripheral blood lymphocytes (PBL) in RA patients, supported those results. VIP is able to reduce production of inflammatory mediators by SF, via TLR signalling pathways³¹⁻³³ and modify the functional capacity of human lymphocytes by inducing Th2/Treg differentiation³⁴. In light of all this evidence, it can be hypothesised that low serum VIP levels may lead to inadequate control of the immune system. In this sense, decreased levels of VIP have been described in patients with autoimmune diseases such as multiple sclerosis³⁵ and autoimmune thyroiditis, in this case associated with high levels of VIPase autoantibodies³⁶. Besides, reduced levels of VIP are associated with more severe disease in Chagas cardiomyopathy³⁷ and juvenile idiopathic arthritis with clinical evidence of cardiac autonomic neuropathy³⁸. In rheumatic diseases it has been described the association between low VIP levels in serum and worse outcomes in patients with RA and SpA^{22,23} and joint damage in osteoarthritis patients^{39,40}.

Our results show that variants in *VIP* gene affect its serum levels in EA patients. Specifically, we reported that rs35643203 and rs12201140, which are located in intron regions 1 and 4, respectively (Figure 1A), are associated with a lower concentration of VIP in serum. The mechanisms through which those SNPs regulate the expression of VIP levels remain unclear, but several SNPs located in intronic regions of genes such as *STAT4* and *CLEC16A* have been reported to modify expression of their mRNA and confer a higher risk of developing RA^{41,42}. It has been suggested that the presence of SNPs in intronic regions could affect splicing efficiency by generating a transcript that lacks an exon, as described for the *HMGCR* gene^{43,44}, or by altering the stability of mRNA, as described for the *MDR1* gene⁴⁵. However, functional significance of the SNPs herein remains to be elucidated.

By contrast, rs688136, located at exon 7 encoding for 3'UTR region of the mRNA, was associated with increased levels of VIP. Since 3'UTR region can include regulatory sequences, polymorphisms in this area could elude regulatory mechanisms thus resulting in the modification of VIP expression. One of these mechanisms are miRNAs, small RNA endogenous species that primary target the 3'UTR of mRNA transcripts. It is well known its role in suppressing translation or inducing degradation of mRNA^{46,47} consequently

modulating gene expression. A putative target sequence of the miR-205-5p was identified in the *VIP* 3'UTR nearby the rs688136. Our data suggest that the C allelic variant in that SNP is not recognized as efficiently as the T variant by miR-205-5p, resulting in increased *VIP* mRNA expression and also in high serum levels of this peptide. There are indeed several studies showing how the presence of SNPs in 3'UTR can affect microRNA binding and, thus, its regulatory function on gene expression⁴⁸⁻⁵⁰.

We also contributed to the development of a variable that allow us to assess the effect of genotypes combinations associated to serum *VIP* levels, the *Interaction Score*. This variable could potentially correlate with clinical outcomes as we have previously described for serum levels²².

Our study is subject to a series of limitations. First, and not surprisingly, serum *VIP* levels cannot be thoroughly explained by the presence of the genetic variants described herein. Consequently, other mechanisms must be involved in the modulation of serum *VIP* levels. It is necessary to perform more in-depth studies in other regulatory mechanisms recently described in RA, such as epigenetic changes. Second, our data set comes from a single cohort of patients. However, it should be noted that a replication of our results was performed in two independent subpopulations separated by a temporary space of more than a year. Moreover, the longitudinal design enabled us to evaluate a considerable number of observations and to better control individual variations. Third, the intensity of treatment is a time-dependent variable and is therefore affected by changes in therapeutic strategies and physicians. In order to overcome this limitation, all our analyses have been properly adjusted. Besides, we have a cohort in which the performance criteria are homogeneous and a complete, rigorous and exhaustive collection of data on treatment with DMARDs is accomplished along the follow-up.

On the other hand, it is well known that severity assessment in RA patients is very difficult because it is a compendium of biological, social and psychological factors. Moreover, being arthritis a multifactorial disease, the classical outcomes not always show the expected efficacy. In this sense, the need for treatment is a pertinent surrogate marker of disease severity in early arthritis cohorts¹⁰.

To sum up, we demonstrate an association between serum *VIP* levels and variants in the *VIP* gene in EA patients. Functional findings suggest the potential involvement of the 3'UTR region in the modulation of *VIP* gene expression, possibly through a miRNA-mediated mechanism. We also describe an interaction between different genetic variants and how certain combinations of genotypes of these variants are associated to a higher intensity of treatment in our patients.

The identification of polymorphisms associated to *VIP* serum levels would complement the clinical assessment of the severity in rheumatoid arthritis patients.

Patients and Methods

Study population

Princesa Early Arthritis Register Longitudinal (PEARL) study comprises patients referred to the Early Arthritis Clinic at Hospital Universitario La Princesa, Madrid (Spain). Inclusion criteria are at least one swollen joint and symptoms for less than one year. The register protocol includes collection of socio-demographic clinical and therapeutic data,

as well as samples of 5 scheduled visits (0, 6, 12, 24 and 60 months). A more detailed description of the PEARL protocol has been published elsewhere⁵¹.

For this study we analyzed data from patients with at least 2 years of follow-up, either those who met 1987 American College of Rheumatology criteria for RA⁵² or those considered undifferentiated arthritis (UA)⁵³ since other specific diagnoses were ruled out. During the 1980s the term “undifferentiated arthritis” had been used to refer to a subpopulation of patients that falls within the spectrum of spondyloarthritis. However, during the first decade of this century, UA was more commonly used to refer to a disease that could be considered a pre-RA disorder in a considerably proportion of patients⁵³⁻⁵⁶. The characteristics of these subpopulations of PEARL included in the present study (91 patients for the discovery phase and 131 for the validation phase) are shown in Table 1. The Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa Research Ethics Committee reviewed and approved the protocol of PEARL study (PI-518) and all experiments were performed in accordance with the guidelines and regulations of this committee. All patients signed an informed consent form before data were included in the register and biological samples were stored at the local Biobank.

Measurement of serum VIP level

VIP levels were assessed using a commercially available competitive enzyme immunoassay kit (Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions. In order to avoid the effect of inter-assay variability of this test in the measurements of each patient, all samples corresponding to consecutive visits from the same patient were measured together on the same plate. The intra-assay and inter-assay variation coefficients were $\leq 5\%$ and 15% as previously described²².

Genetic studies

Screening DNA sequencing

Genomic DNA was isolated from whole blood using the QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). We selected 20 patients from the discovery population which displayed extreme baseline serum VIP levels, 11 of them had serum VIP levels above 601 pg/ml and the remaining 9 patients had serum VIP levels below 272 pg/ml [p75 and p25 of a control population respectively²²]. The characteristics of these PEARL subpopulation used for the sequencing analysis are shown in Supplementary Table 1.

Amplification primers were designed to produce overlapping PCR amplicons to cover the region between positions 153071932 and 153080900 (GRCh37.p13) of chromosome 6, which includes the promoter and the gene of VIP. A total of 58 PCR primer pairs were designed, including the M13 universal primer sequence (M13 forward primer sequence, 5'- TGTAACGACGCGCCAGT-3'; and M13 reverse primer sequence, 5'- CAGGAAACAGCTATGACC-3') to generate 29 amplicons ranging between 393 bp and 788 bp (Figure 1A and Supplementary Table 2). Amplification and cycle sequencing were performed using the BigDye Direct Cycle Sequencing Kit, purified using the BigDyeX Terminator Purification Kit and sequencing by 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems Division).

SNP genotyping

Genetic variants selected in the sequencing screening were genotyped in 91 and 131 EA patients from PEARL for discovery and validation phases of the study respectively.

The elected VIP genetic variants rs12213214, rs140023105, rs35643203, rs3799142, rs7764067, rs3823082, rs12201173, rs71575932, rs74760293, rs149081483 and rs688136 were genotyped using a pre-designed single nucleotide polymorphism (SNP) Genotyping Assays (Part numbers: C__27847302_10, C__27855145_10, C__3250637_10, C__27502877_20, C__29430252_10, C__27491244_10, C__32237894_10, C__3250638_10, C__25962626_10, C__172567893_10, C__3250639_10, respectively) and rs60946248 and rs185451870 were genotyped using custom SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems Division).

After PCR, the genotype of each sample was attributed automatically by measuring allele-specific fluorescence on a CFX Touch Real-Time PCR System using the software CFX 3.1 Manager (BioRad). Duplicate samples and negative controls were included to verify genotyping accuracy.

The genotype of rs12201030, rs7755568 and rs12201140 was obtained by sequencing amplicon 17 as we described above (see amplicon information in Supplementary Table 2). These SNPs are located in a low complexity region with a predominance of A and T bases, making it impossible to obtain specific TaqMan probes.

Generation of VIP 3' UTR Luciferase Reporter Vectors

Neuroblastoma cell line SH-SY5Y was used to obtain the VIP 3' untranslated region (3'UTR) where rs688136 is located. That region was amplified by means of PCR using forward and reverse custom primers with the restriction sites for XhoI and NotI added (primer forward 5'-TGAAAAAGACCTTTGGAGCAAAGCTGATGACAA-3', primer reverse, 5'-CAGGAGAGTAGAACAGATAATCAGTGTGTCTAAATTTG-3'). The PCR amplified 3'UTR 333 bp region was cloned into the PsiCheck-2 vector (Promega) in which two different luciferase genes (Firefly and Renilla) driven by separated promoters are present. VIP 3'UTR inserts (containing T or C allele for the rs688136) were cloned following the Renilla luciferase gene, which serves as the reporter, while the Firefly luciferase gene is the internal control.

Transformation was performed in competent bacteria and transformed colonies were selected by culturing in presence of Ampicillin.

Transfection and Luciferase Assay

Jurkat cells were grown to a 10⁶/ml confluence in complete media (RPMI, 10% FBS and 1% Penicillin/Streptomycin). Then, 10⁷ cells were electroporated with 20ug of the PsiCheck-2 vector constructions (alleles T or C) and, in the co-transfection experiments, 2 pmol of miRCURY LNA microRNA Mimics (Exiqon), cel-miR-39-3p (microRNA Mimic control) and has-miR-205-5p. Positive controls containing the empty PsiCheck-2 vector were included. After culturing for 24h at 37°C, transfected cells were lysed in 500ul 1X passive lysis buffer (Promega). Lysates were used in each dual luciferase reaction, conducted according to the manufacturer's instructions (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega). Triplicate Renilla measurements were performed using FLUOstar Omega luminometer (BMG Labtech) and normalized to Firefly measurements.

Luminescence measures of has-miR-205-5p co-transfected cells were normalized to the corresponding measurements of cel-miR-39-3p co-transfected cells.

Statistical analysis

Normally distributed quantitative variables are expressed as the mean \pm standard deviation, while non-normally distributed variables were expressed as the median and interquartile range (IQR). In case of Normal distribution, bivariate analyses were performed using the *t* test, while Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test were used for non-normal variables.

Additional variables were defined to further describe the impact of *VIP* genetic variants in its protein serum levels and in the course of arthritis. The variable *Interaction Score* was developed as a measure of the effect of the combination of different genotypes, clustering patients in four categories. On the other hand, since the implementation of the early “treat to target” EULAR recommendation strategy in PEARL patients have yielded similar disease activity outcomes, rates of remission and decrease of radiological progression in either ACPA positive and negative patients, we decided to use the intensity DMARD treatment (IDT)⁵⁷ as a surrogate variable of severity to study whether genetic variants in *VIP* could be associated with severity in early arthritis patients. IDT was assessed as the number of days of treatment with each DMARD during follow-up adjusted for weighted coefficients, as described elsewhere⁵¹.

Serum *VIP* levels showed a distribution almost normal in both sets of patients. On average, we have measurements of at least, 3 samples per patient, corresponding to different follow-up visits, in order to minimize the intra-assay variability. Nevertheless, we had previously reported that *VIP* serum levels do not vary relevantly during the follow-up²². However, considering that several variables may contribute to slight modifications in *VIP* levels as well as they can interact with the effect of variants of *VIP* gene on these levels, we performed several multivariate analyses based on generalized estimating equations nested by patient and visit using the *xtgee* command of Stata 12 for Windows (Stata Corp LP, College Station, Texas, USA). This model allows us to achieve a better adjusted *VIP* value for each patient. First, we performed the multivariate models by adding all variables with a *p* value <0.15 in the bivariate analysis. Then, we used the manual backward-stepwise selection to fit the final models by sequentially removing variables with $p>0.15$. Multivariable models were in all cases adjusted by the variable “assay plate” in order to minimize the inter-assay variability. Since the intensity of treatment is a variable calculated at a specific point of follow-up (after two years), the adjustment of the multivariate model for its study was performed by means of generalized linear models using the Stata *glm* command.

Data availability

All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due to the confidential nature of the clinical data, but are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- 1 Furst, D. E. & Emery, P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. *Rheumatology (Oxford)*. **53**, 1560-1569 (2014).
- 2 MacGregor, A. J. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. **43**, 30-37 (2000).
- 3 Karlson, E. W. & Deane, K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. **38**, 405-426 (2012).
- 4 Sparks, J. A. *et al.* Associations of Smoking and Age With Inflammatory Joint Signs Among Unaffected First-Degree Relatives of Rheumatoid Arthritis Patients: Results From Studies of the Etiology of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. **68**, 1828-1838 (2016).
- 5 He, J. *et al.* Dietary intake and risk of rheumatoid arthritis-a cross section multicenter study. *Clin Rheumatol*. **35**, 2901-2908 (2016).
- 6 Alamanos, Y. & Drosos, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. **4**, 130-136 (2005).
- 7 Scott, D. L., Wolfe, F. & Huizinga, T. W. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. **376**, 1094-1108 (2010).
- 8 van Nies, J. A. *et al.* What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review. *Ann Rheum Dis*. **73**, 861-870 (2014).
- 9 van Nies, J. A., Tsonaka, R., Gaujoux-Viala, C., Fautrel, B. & van der Helm-van Mil, A. H. Evaluating relationships between symptom duration and persistence of rheumatoid arthritis: does a window of opportunity exist? Results on the Leiden early arthritis clinic and ESPOIR cohorts. *Ann Rheum Dis*. **74**, 806-812 (2015).
- 10 Gonzalez-Alvaro, I. *et al.* Biomarkers predicting a need for intensive treatment in patients with early arthritis. *Curr Pharm Des*. **21**, 170-181 (2015).
- 11 Abad, C. *et al.* Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology*. **124**, 961-971 (2003).
- 12 Li, H., Mei, Y., Wang, Y. & Xu, L. Vasoactive intestinal polypeptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses. *J Clin Immunol*. **26**, 430-437 (2006).
- 13 Lodde, B. M. *et al.* Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. **65**, 195-200 (2006).
- 14 Jimeno, R. *et al.* New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol*. **88**, 734-745 (2010).
- 15 Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Leceta, J. & Gomariz, R. P. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med*. **7**, 563-568 (2001).
- 16 Carrion, M. *et al.* VIP impairs acquisition of the macrophage proinflammatory polarization profile. *J Leukoc Biol*. (2016).
- 17 Ganea, D. & Delgado, M. The neuropeptides VIP/PACAP and T cells: inhibitors or activators? *Curr Pharm Des*. **9**, 997-1004 (2003).
- 18 Jimeno, R. *et al.* Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells. *J Mol Neurosci*. **54**, 512-525 (2014).
- 19 Jimeno, R. *et al.* Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect. *J Leukoc Biol*. **98**, 257-269 (2015).
- 20 Prasse, A. *et al.* Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. **182**, 540-548 (2010).
- 21 Ganea, D., Hooper, K. M. & Kong, W. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases. *Acta Physiol (Oxf)*. **213**, 442-452 (2015).
- 22 Martinez, C. *et al.* Serum levels of vasoactive intestinal peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS One*. **9**, e85248 (2014).
- 23 Seoane, I. V. *et al.* Vasoactive Intestinal Peptide in Early Spondyloarthritis: Low Serum Levels as a Potential Biomarker for Disease Severity. *J Mol Neurosci*. **56**, 577-584 (2015).
- 24 International Human Genome Sequencing, C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. **431**, 931-945 (2004).
- 25 Gabriel, S. B. *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. **296**, 2225-2229 (2002).
- 26 Viatte, S., Plant, D. & Raychaudhuri, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. **9**, 141-153 (2013).
- 27 Delgado, M. & Ganea, D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino acids*. **45**, 25-39 (2013).
- 28 Gomariz, R. P. *et al.* VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann NY Acad Sci*. **1070**, 51-74 (2006).
- 29 Gomariz, R. P., Martinez, C., Abad, C., Leceta, J. & Delgado, M. Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des*. **7**, 89-111 (2001).

- 30 Said, S. I. *et al.* Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation*. **115**, 1260-1268 (2007).
- 31 Juarranz, M. G. *et al.* Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)*. **43**, 416-422 (2004).
- 32 Gutierrez-Canas, I. *et al.* VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*. **45**, 527-532 (2006).
- 33 Carrion, M. *et al.* RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum.* **63**, 1626-1636 (2011).
- 34 Gutierrez-Canas, I. *et al.* Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun.* **22**, 312-317 (2008).
- 35 Andersen, O., Fahrenkrug, J., Wikkelsø, C. & Johansson, B. B. VIP in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Peptides*. **5**, 435-437 (1984).
- 36 Bangale, Y. *et al.* VIPase autoantibodies in Fas-defective mice and patients with autoimmune disease. *FASEB J.* **17**, 628-635 (2003).
- 37 Correa, M. V. *et al.* Low levels of vasoactive intestinal peptide are associated with Chagas disease cardiomyopathy. *Hum Immunol.* **74**, 1375-1381 (2013).
- 38 El-Sayed, Z. A. *et al.* Cardiovascular autonomic function assessed by autonomic function tests and serum autonomic neuropeptides in Egyptian children and adolescents with rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)*. **48**, 843-848 (2009).
- 39 Jiang, W. *et al.* Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: a new indicator of disease severity? *Clin Biochem.* **45**, 1607-1612 (2012).
- 40 Jiang, W., Wang, H., Li, Y. S. & Luo, W. Role of vasoactive intestinal peptide in osteoarthritis. *J Biomed Sci.* **23**, 63 (2016).
- 41 Lamana, A. *et al.* The TT genotype of the STAT4 rs7574865 polymorphism is associated with high disease activity and disability in patients with early arthritis. *PLoS One*. **7**, e43661 (2012).
- 42 Skinningsrud, B. *et al.* A CLEC16A variant confers risk for juvenile idiopathic arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* **69**, 1471-1474 (2010).
- 43 Burkhardt, R. *et al.* Common SNPs in HMGR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon13. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **28**, 2078-2084 (2008).
- 44 Medina, M. W., Gao, F., Ruan, W., Rotter, J. I. & Krauss, R. M. Alternative splicing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is associated with plasma low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin. *Circulation*. **118**, 355-362 (2008).
- 45 Hoffmeyer, S. *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 3473-3478 (2000).
- 46 Kim, V. N. & Nam, J. W. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* **22**, 165-173 (2006).
- 47 Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N. & Filipowicz, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* **17**, 118-126 (2007).
- 48 Paladini, F. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the 3'UTR of VPAC-1 cooperate in modulating gene expression and impact differently on the interaction with miR525-5p. *PLoS One*. **9**, e112646 (2014).
- 49 Vosa, U., Esko, T., Kasela, S. & Annilo, T. Altered Gene Expression Associated with microRNA Binding Site Polymorphisms. *PLoS One*. **10**, e0141351 (2015).
- 50 Morini, E. *et al.* The human rs1050286 polymorphism alters LOX-1 expression through modifying miR-24 binding. *J Cell Mol Med.* **20**, 181-187 (2016).
- 51 Gonzalez-Alvaro, I. *et al.* Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis. *PLoS One*. **6**, e29492 (2011).
- 52 Arnett, F. C. *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31**, 315-324 (1988).
- 53 Verpoort, K. N. *et al.* Undifferentiated arthritis--disease course assessed in several inception cohorts. *Clin Exp Rheumatol.* **22**, S12-17 (2004).
- 54 Raza, K. & Filer, A. Predicting the development of RA in patients with early undifferentiated arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* **23**, 25-36 (2009).
- 55 van der Helm-van Mil, A. H. *et al.* A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions. *Arthritis Rheum.* **56**, 433-440 (2007).
- 56 Quinn, M. A. *et al.* Prognostic factors in a large cohort of patients with early undifferentiated inflammatory arthritis after application of a structured management protocol. *Arthritis Rheum.* **48**, 3039-3045 (2003).
- 57 Felson, D. T., Anderson, J. J. & Meenan, R. F. Use of short-term efficacy/toxicity tradeoffs to select second-line drugs in rheumatoid arthritis. A metaanalysis of published clinical trials. *Arthritis Rheum.* **35**, 1117-1125 (1992).

Acknowledgements

The authors are grateful to the patients of the PEARL and to Miguel V. Manzanares (PhD) and Ricardo Villares (PhD) for their assistance on cloning experiments and luciferase assay.

Author Contributions

R.P.G., I.G-Á, C.M. and A.L., contributed to the study design. A.L., I.V.S. and V.C.T. performed the experiments. A.M.O., I.G-Á. and R.G-V. collected samples and data of patients from PEARL. I.G-Á., I.V.S. and A.L. conceived and performed all analyses. R.P.G., I.G-Á. I.V.S., A.L., Y.J. and C.M. prepared the manuscript. All authors reviewed and approved its final version.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper

Competing financial interests: The authors declare that they have no competing interests.

Funding: This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (Grant N° PI14/00477, PI11/00195, PI11/00505, PI12/0758, RETICS RD12/0009/0002, RD16/0012/0008) and by the Ministerio de Economía y Competitividad (RTC-2015-3562-1), cofinanced by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Ms Seoane is recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación Cultura y Deporte.

Artículo 4

Clinical Relevance of VPAC1 Receptor Expression in Early Arthritis: Association with IL-6 and Disease Activity.

Seoane IV, Ortiz AM, Piris L, Lamana A, Juarranz Y, García-Vicuña R, González-Álvaro I, Gomariz RP, Martínez C. *PLoS One*. **2016** Feb 16;11(2):e0149141. doi: 10.1371/journal.pone.0149141

RESEARCH ARTICLE

Clinical Relevance of VPAC1 Receptor Expression in Early Arthritis: Association with IL-6 and Disease Activity

Iria V. Seoane¹, Ana M. Ortiz², Lorena Piris³, Amalia Lamana², Yasmina Juarranz¹, Rosario García-Vicuña², Isidoro González-Álvaro², Rosa P. Gomariz^{1‡}, Carmen Martínez^{4‡*}

1 Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **2** Servicio de Reumatología, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, Madrid, Spain, **3** Unidad de Apoyo Metodológico, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, Madrid, Spain, **4** Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

‡ These authors share senior authorship.

* cmmora@bio.ucm.es



OPEN ACCESS

Citation: Seoane IV, Ortiz AM, Piris L, Lamana A, Juarranz Y, García-Vicuña R, et al. (2016) Clinical Relevance of VPAC1 Receptor Expression in Early Arthritis: Association with IL-6 and Disease Activity. PLoS ONE 11(2): e0149141. doi:10.1371/journal.pone.0149141

Editor: Paul Proost, University of Leuven, Rega Institute, BELGIUM

Received: October 31, 2015

Accepted: January 27, 2016

Published: February 16, 2016

Copyright: © 2016 Seoane et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (Grant N° PI14/00477, PI14/001236, PI11/00195, PI11/00505, PI12/0758, RD12/0009) cofinanced by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), and by FEDER funds from EU, S2010/BMD-2350 from Comunidad de Madrid. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

The vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors VPAC1 and VPAC2 mediate anti-inflammatory and immunoregulatory responses in rheumatoid arthritis (RA). Data on the expression of these receptors could complement clinical assessment in the management of RA. Our goal was to investigate the correlation between expression of both receptors and the 28-Joint Disease Activity Score (DAS28) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with early arthritis (EA). We also measured expression of IL-6 to evaluate the association between VIP receptors and systemic inflammation.

Methods

We analyzed 250 blood samples collected at any of the 5 scheduled follow-up visits from 125 patients enrolled in the Princesa Early Arthritis Register Longitudinal study. Samples from 22 healthy donors were also analyzed. Sociodemographic, clinical, and therapeutic data were systematically recorded. mRNA expression levels were determined using real-time PCR. Then, longitudinal multivariate analyses were performed.

Results

PBMCs from EA patients showed significantly higher expression of VPAC2 receptors at baseline compared to healthy donors ($p < 0.001$). With time, however, VPAC2 expression tended to be significantly lower while VPAC1 receptor expression increased in correlation with a reduction in DAS28 index. Our results reveal that more severe inflammation, based on high levels of IL-6, is associated with lower expression of VPAC1 ($p < 0.001$) and conversely with increased expression of VPAC2 ($p < 0.001$). A major finding of this study is that

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

expression of VPAC1 is lower in patients with increased disease activity ($p = 0.001$), thus making it possible to differentiate between patients with various degrees of clinical disease activity.

Conclusion

Patients with more severe inflammation and higher disease activity show lower levels of VPAC1 expression, which is associated with patient-reported impairment. Therefore, VPAC1 is a biological marker in EA.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a common autoimmune disease with a heterogeneous clinical course and various pathogenic mechanisms leading to chronic synovitis and joint destruction. Macrophages, lymphocytes and other effector cell types, along with a wide range of inflammatory and growth factors, are involved in a complex network whose balance is shifted both systemically and locally towards a proinflammatory state [1]. The main features of RA are joint pain, swelling and stiffness, as well as increased levels of acute phase reactants. These features correlate with joint damage and are commonly used to assess the activity of RA [2]. Frequent measurement of disease activity is recommended by the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism [3], the European League Against Rheumatism [4] and the treat-to-target international task force [5], with a clear goal, namely, reducing, if not eliminating, inflammation to facilitate remission in the fastest possible way [6]. For this reason, many investigators aim to identify biological markers reflecting underlying pathophysiological processes associated with the clinical activity of RA.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a broadly distributed peptide produced by neural, endocrine and immune cells. Multiple studies have shown its involvement in the maintenance of homeostasis and health [7–9].

The potent immunomodulatory functions of VIP have been demonstrated both *in vivo*, in a murine model of collagen-induced arthritis [10], and *ex vivo*, in cultured fibroblast-like synoviocytes and in peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis [10, 11]. We recently reported promising findings about the role of endogenous VIP in early arthritis (EA), showing that patients with low baseline VIP levels have worse disease outcome [12]. The protective effect of VIP has been attributed to 3 key features: anti-inflammatory properties, regulation of CD4⁺ T-cell subpopulations and modulation of mediators involved in the destruction of bone and cartilage [10, 13–15].

VIP triggers its biological responses by interacting with 2 subtypes of the class B family of G protein-coupled receptors, VPAC1 and VPAC2 [16]. VPAC1 is constitutively expressed in monocytes/macrophages and lymphocytes [17]. VPAC2 has also been described in lymphocytes and macrophages as an inducible receptor after immune stimulation [17]. Dynamic regulation of VPAC1 and VPAC2 receptors has been reported in both physiological and pathological processes [18]. Thus, altered expression of VPAC2 receptor has been reported in monocytes isolated from patients with Sjögren's syndrome [19] and in activated CD4⁺ T cells from patients with multiple sclerosis [20]. Furthermore, decreased VPAC1 surface expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [21] and increased VPAC2 expression in fibroblast-like synoviocytes [22] have been demonstrated in RA. Although these findings reveal abnormal expression of VIP receptors in autoimmune diseases, their association with clinical course has not been investigated.

Given the ability of VIP to regulate the intensity of the inflammatory process and the immune response, together with the particular expression pattern of VIP receptors in RA, we hypothesized that expression of VPAC1 and VPAC2 might be associated with disease activity and would thus reflect the patient's clinical status.

Therefore, our goal was to investigate the association between the expression of VIP receptors during the follow-up of patients with EA and the degree of systemic inflammatory activation. To do so, we evaluated IL-6 expression levels and assessed the well-recognized disease activity score based on the assessment of 28 joints (DAS28) [23].

Materials and Methods

Ethics statement

This study was undertaken in compliance with the Declaration of Helsinki. The protocol for the Princesa Early Arthritis Register Longitudinal (PEARL) study was reviewed and approved by the Ethics Committee for Clinical Research at the Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa. All patients were informed about the study and signed an informed consent form before inclusion in the register.

Patients and Controls

The PEARL study includes patients with more than 1 swollen joint for at least 4 weeks and symptoms for less than a year. The register protocol includes collection of socio-demographic, clinical and therapeutic data, as well as samples at each of the 5 scheduled visits (baseline, 6, 12, 24 and 60 months). A more detailed description of the protocol has been published elsewhere [12].

For the present study, we used 250 blood samples collected during the follow-up of 125 patients enrolled in the PEARL study. Among these, 79 fulfilled the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for Rheumatoid Arthritis [24] and 46 patients were diagnosed with chronic undifferentiated arthritis. None of these 46 patients fulfilled the criteria for other inflammatory disorders (infectious arthritis, microcrystalline arthritis, connective tissue diseases, spondyloarthritis or psoriatic arthritis). Regarding received treatment, there were 85 visits in which patients were not under disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) treatment, mostly baseline visits and few follow-up visits from patients with mild disease. In 128 visits patients were under DMARD monotherapy: 65% on methotrexate (MTX), 20% on leflunomide (LEF), 10% on antimalarials (AM) and other DMARDs 5%. Finally, in 37 visits patients received combined DMARD treatment with a very heterogeneous profile including MTX+LEF (40%), MTX+AM (18%) and TNF-blockers+ different DMARDs (26%), other combinations included MTX+SSZ, LEF+SSZ, LEF+AM and so on.

Healthy donors ($n = 22$) were recruited from Hospital Universitario de La Princesa. This group included 9 women and 13 men, whose median and interquartile range (IQR) age was 38 (30–49).

Semiquantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay

PBMCs from EA patients and blood samples from healthy donors were isolated using Ficoll density gradient centrifugation (Histopaque-1077™, Sigma-Aldrich). The expression of VPAC1, VPAC2 and IL-6 in PBMCs was analyzed by RT-PCR. Total RNA was obtained from PBMCs using TRI Reagent™ (Sigma-Aldrich), and 2 µg was reverse transcribed using the High

Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Complementary DNA (25 ng/well) was amplified by semiquantitative real-time PCR performed with TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) using manufacturer-predesigned primers (Applied Biosystems. VPAC1: Hs00270351_m1; VPAC2: Hs00173643_m1; IL-6: Hs00985639_m1). Data were normalized for relative quantification and expressed in reference to the β -actin housekeeping gene using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula, as previously described [22].

Statistical analysis

Descriptive analysis: quantitative variables were represented as the mean \pm standard deviation (SD). Variables with equal variances were analyzed using the *t* test or ANOVA (analysis of variance). Comparisons between the groups were made a posteriori using multiple comparison tests. The Mann Whitney or Kruskal-Wallis test was used for variables with unequal variances, and intergroup comparison was done by the multiple comparison test—non-parametric posteriori test. Homoscedasticity was assessed using Levene's test and an ANOVA or *t*-test ($n > 30$). Normality was not assessed. The trend test was used to study the evolution of VPAC1, VPAC2, the VPAC1:VPAC2 ratio and IL-6 during follow-up.

The association between expression of VPAC receptors and disease activity based on DAS28 was analyzed using univariate and multivariate GEE (generalized estimating equations method) with gaussian family and identity link function. Variability in the statistics derived from visit observations was analyzed using exchangeable correlation structures. The multivariate model included variables with $p < 0.20$ in the univariate analysis. Considering that the raw data for gene expression contained left-shifted values, we decided to censor values above the 95th percentile. An appropriate transformation was applied to perform the analysis in cases of non-normal distribution. The association between quantitative variables was analyzed using Spearman's correlation test. *p* values ≤ 0.05 were considered statistically significant. The statistical analyses were performed using Stata 13 for Windows (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

Results

Patient characteristics. Expression of VPAC1 and VPAC2 in PBMCs during follow-up

A total of 125 patients with RA ($n = 79$) or chronic undifferentiated arthritis ($n = 46$) were included in the study. Patients who fulfilled the 1987 criteria for RA [25] had more severe disease at baseline and a higher positivity of 2 validated biomarkers of diagnosis and severity (rheumatoid factor [RF] and anti-citrullinated peptide antibodies [ACPA]) than patients with undifferentiated arthritis (Table 1).

During follow-up protocol, disease activity was evaluated. As shown in Fig 1, significantly lower scores in disease activity were observed over the course of the disease as a consequence of adjusting treatment with glucocorticoids or DMARDs (see Materials and Methods).

We first analyzed the gene expression of both subtypes of VIP receptors (VPAC1 and VPAC2) in PBMCs isolated at baseline visit from EA patients and from controls. Slightly lower expression of VPAC1 was found in EA patients, although the difference was not statistically significant (1.2 ± 0.1 vs 1.6 ± 0.2 , respectively; $p = 0.1$, Mann-Whitney test). In contrast, PBMCs from patients exhibited significantly higher mRNA levels of VPAC2 than PBMCs from healthy donors (1.7 ± 0.3 vs 0.8 ± 0.1 , respectively; $p < 0.001$, Mann-Whitney test).

Next, we studied expression of VPAC1 and VPAC2 during follow-up. As Fig 2A shows, expression of VPAC1 increased significantly (p -trend = 0.029), reaching the highest values

Table 1. Baseline characteristics of patients with early arthritis.

	Rheumatoid Arthritis (n = 79)	Undifferentiated Arthritis (n = 46)	Total (n = 125)	p-value
Age* (years)	53 [45–70]	52 [40–68]	52 [44–68]	NS
Gender** (female)	82	76	80	NS
Ethnicity** (caucasian)	64 (81%)	41 (89.1%)	105 (84%)	NS
Disease duration* (months)	5.4 [3.1–8.1]	4.6 [2.2–7]	5.1 [2.8–7.7]	0.1
GDA Pat*	50 [30–64]	42 [23–50]	47 [27–58]	0.003
GDA Phy*	50 [32–65]	26 [10–47]	41 [23–55]	<0.001
HAQ*	1.125 [0.750–1.750]	0.875 [0.375–1.125]	1 [0.625–1.500]	0.002
CRP (mg/dl) *	0.9 [0.3–2.3]	0.4 [0.2–0.9]	0.7 [0.2–1.7]	0.014
ESR (mm/h) *	32 [20–55]	21 [13–37]	27 [16–50]	0.036
DAS28 (0–10)*	5.1 [3.7–6.1]	3.6 [2.6–4.8]	4.5 [3.4–5.6]	<0.001
RF+**	72	11	50	<0.001
ACPA+**	66	11	46	<0.001

Data are shown as the *median [interquartile range] or, **n (%). GDA: Global Disease Assessment; Pat: patient; Phy: physician; HAQ: health assessment questionnaire; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; DAS28: 28-joint disease activity score; RF: rheumatoid factor; ACPA: anti-citrullinated peptide antibodies. Statistical significance was established using the Pearson chi-square test for a p value<0.05. NS: non-significant.

doi:10.1371/journal.pone.0149141.t001

after 2 years of follow-up. Conversely, VPAC2 expression decreased (p-trend = 0.024, Fig 2B). (Ct values of real-time PCR assay are shown in S1 Table). In order to assess the relationship between both receptors during follow-up, we evaluated the VPAC1:VPAC2 ratio in PBMCs for each patient. The ratio had increased during follow-up (from 1.3 ± 0.3 at baseline to 7.7 ± 1.6 at 5 years), suggesting dynamic regulation of both receptors (Fig 2C). After adjustment for visits, an inverse correlation between both receptors was confirmed ($r = -0.60$, $p < 0.001$); therefore, increased expression of VPAC1 is associated with decreased expression of VPAC2 (Fig 2D).

As a consequence of limitations in systematic RNA extraction at the beginning of the register, many patients lacked data for all 5 visits. We therefore performed a new analysis considering only those patients with samples from 3 or 4 visits including baseline and similar results were obtained (S1 Fig).

Correlation between VPAC receptors and IL-6 expression in EA patients

IL-6 is considered a marker of systemic inflammation in RA [26]. Therefore, we decided to investigate whether there was an association between IL-6 levels and expression of VIP receptors. First, we evaluated the evolution of IL-6 expression in our EA cohort. As expected, IL-6 levels were highest at the beginning of follow-up and decreased over time (Fig 3A). (Ct values of real-time PCR assay was shown in S1 Table). We then performed a correlation analysis adjusted for the visits. As shown in Fig 3B, expression of VPAC1 was significantly lower at visits where a higher level of IL-6 was detected. Conversely, a significant and positive correlation was detected between this inflammatory marker and VPAC2 expression (Fig 3C).

Association between higher DAS28 levels and reduced VPAC1 receptor expression. Evaluation of subgroups by DAS28 level

Given that the most obvious change during follow-up is that patients improved once they are treated [27], we next analyzed the expression of the receptors taking into account the level of disease activity (remission, low, moderate or high) assessed through DAS28. We performed a

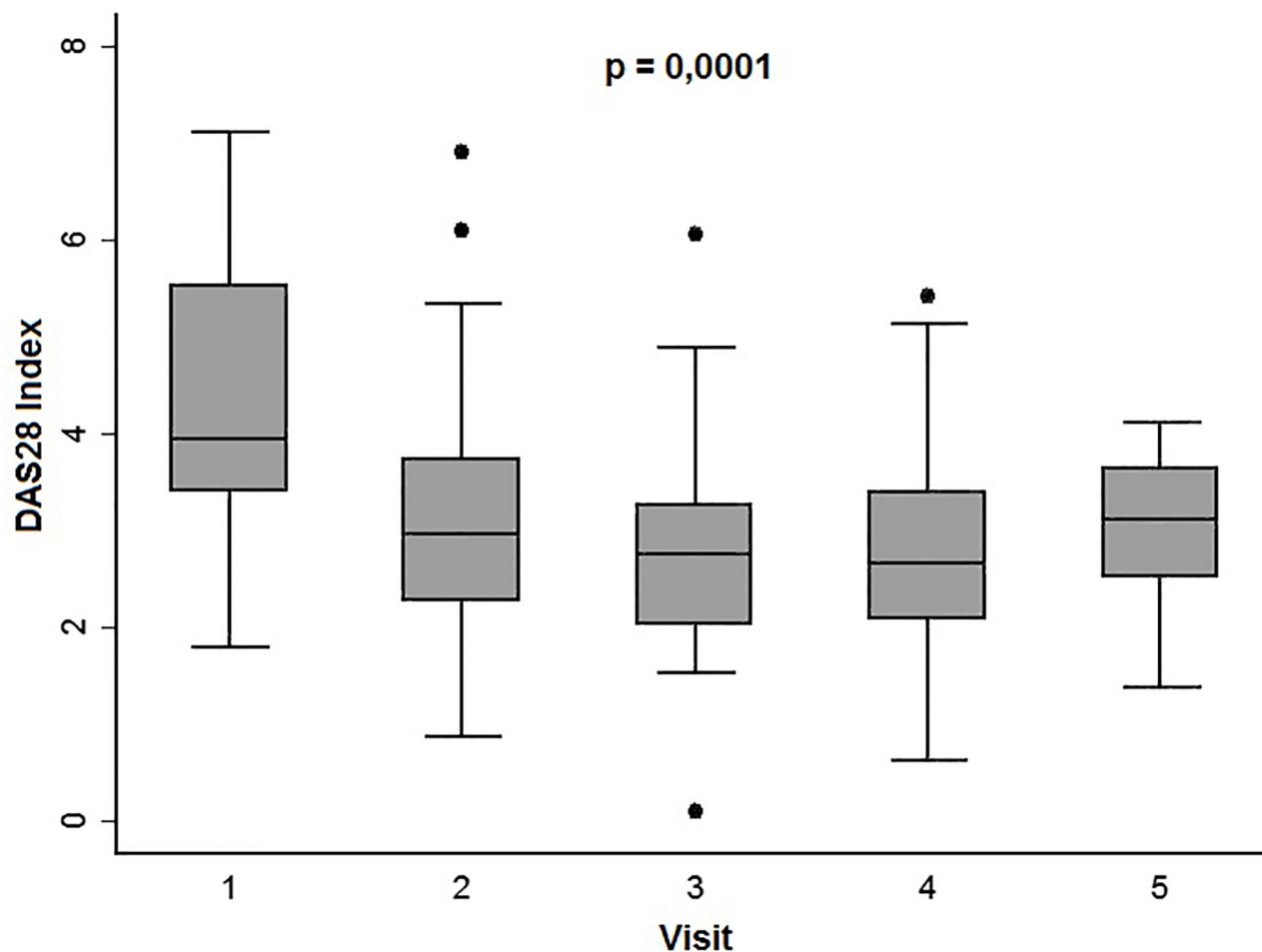


Fig 1. Progress of disease activity estimated by DAS28 at follow-up visits. Data are presented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), p90 (line above the box), and p10 (line below the box). Dots represent outliers. Statistical significance was established using the Kruskal-Wallis test.

doi:10.1371/journal.pone.0149141.g001

multivariate analysis to ensure a more accurate appraisal. Our data showed that higher levels of DAS28 were associated with lower gene expression of VPAC1 (Table 2). Similar results were also observed at protein level (S2 Fig). In addition, VPAC1 expression tended to be significantly higher in patients treated with combinations of disease-modifying antirheumatic drugs and in Latin American patients. We did not detect any association between VPAC2 expression and the variables studied (Table 3).

We analyzed VPAC1 expression in EA patients clustered into 3 sub-groups by their DAS28 levels (remission-low, moderate and high disease activity). As Fig 4 shows, patients with moderate or high activity expressed significantly lower levels of VPAC1. By contrast, patients in remission displayed higher VPAC1 expression.

Correlation between VPAC1 expression and global disease assessed by patients and physicians

Patient perspectives have become an increasingly relevant component of RA outcome measurement, and the physician's global assessment is the only way to quantify the patient's opinion of disease course [28]. Therefore, patient and physician global scores were analyzed. A

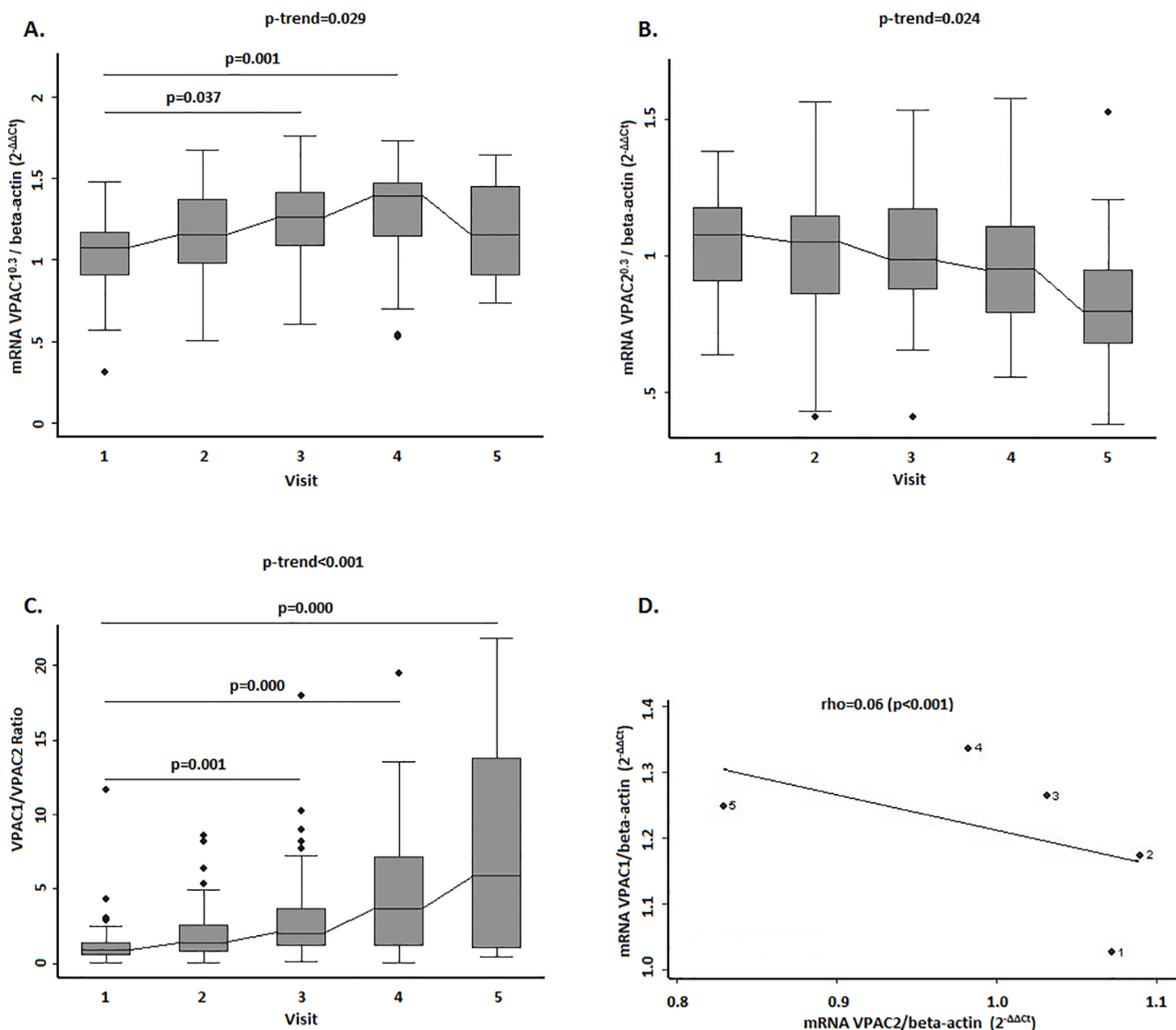


Fig 2. Evolution of gene expression levels of VPAC1 and VPAC2 in PBMCs from EA patients. (A) and (B) Variation in gene expression levels of VPAC1 (panel A) and VPAC2 (panel B) receptors at follow-up visits. (C) Evolution of the ratio of gene expression of both receptors during the follow-up. (D) Correlation between gene expression levels of VPAC1 and VPAC2 receptors. Statistical significance was established using the Trend test and non-parametric posteriori test (Dunnnett) for intergroup comparison, in panels A, B and C. In panel D, the significance level was obtained by means of a generalized linear model nested by patient and visit. In panel D dots represent average data from patients clustered by visits from 1 to 5. Data of A, B and C panels are represented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), p90 (line above the box), and p10 (line below the box) of the expression of VPACs receptors. Mathematical transformation for VPAC expression: raised to 0.3. Dots represent outliers.

doi:10.1371/journal.pone.0149141.g002

negative correlation was observed between VPAC1 expression and global disease activity both by the patient and by the physician (Table 4). As VPAC1 seems to be a marker of disease activity in EA, we decided to compare it with 2 acute phase reactants that are commonly used to monitor disease activity in RA, namely, the erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP). Both of them correlate well with IL-6 levels, however it has been described that they are subject to a gender bias [29]. Consequently, a more useful biological marker for disease activity is needed.

Since ESR is included in the DAS28, we used global disease assessment by the physician and the patient as an independent gold standard to compare VPAC1 expression with ESR and CRP

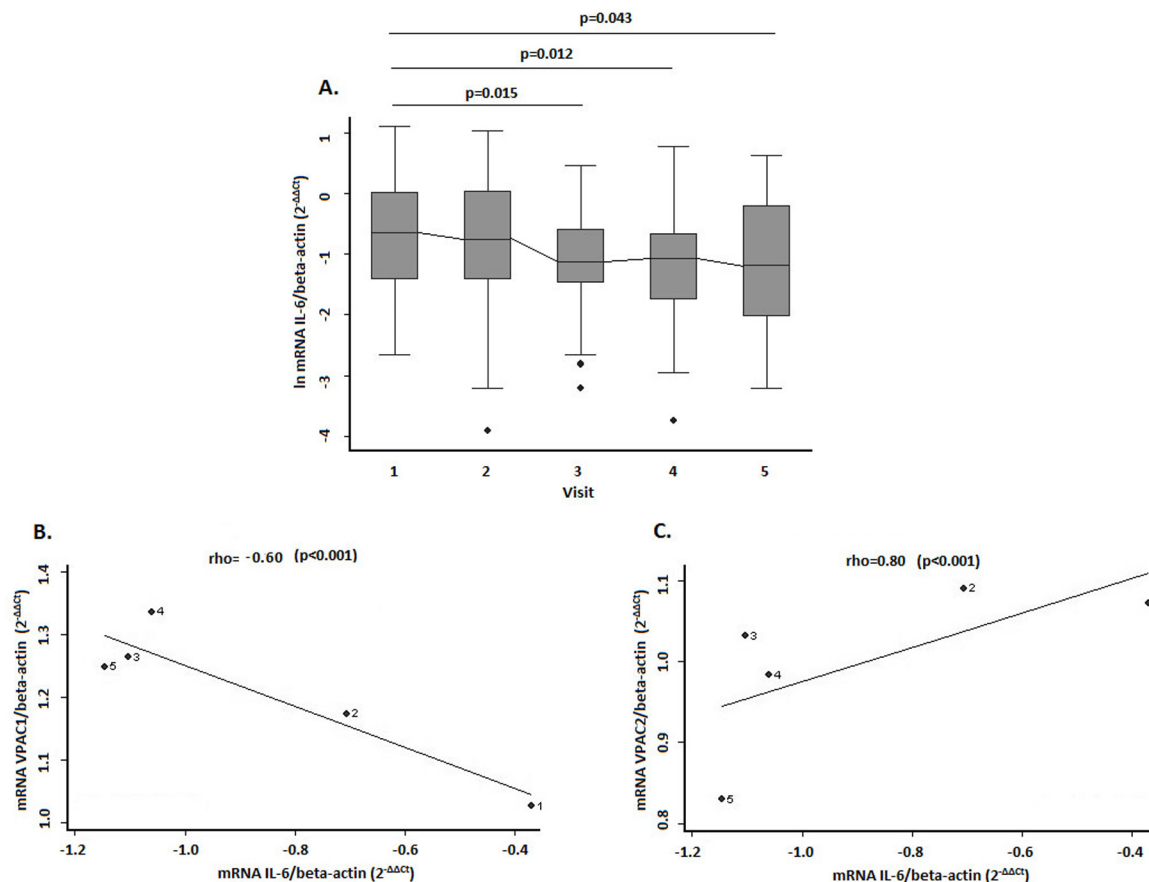


Fig 3. Correlation between gene expression levels of VPACs receptors and IL-6 in PBMCs from EA patients. (A) Evolution of IL-6 expression in the EA cohort during the follow-up. Data are represented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), p90 (line above the box), and p10 (line below the box) of the expression of IL-6. Dots represent outliers. (B) and (C) Correlation between gene expression of VPAC1 and IL-6 (panel B) and between VPAC2 and IL-6 (panel C). Statistical significance was established using the Trend test and non-parametric posteriori test (Dunnnett) for intergroup comparison, in panel A. In panels B and C the significance level was obtained by means of a generalized linear model nested by patient and visit. In panels B and C dots represent data from patients clustered by visits from 1 to 5.

doi:10.1371/journal.pone.0149141.g003

values. As shown in Table 4, although serum CRP correlated slightly better with both assessments than VPAC1 expression, VPAC1 was more useful than ESR in estimating global disease activity (Table 4).

Discussion

Knowledge of deregulated key factors in the pathophysiological processes of RA can complement clinical assessment [30]. Many studies have emphasized the importance of VIP and their receptors in modulating inflammatory and immune responses in RA [10, 11, 13, 31]. In recent years, VIP levels have emerged as a suitable prognostic biomarker in EA, since patients who are unable to up-regulate VIP have a poorer clinical course [12]. In the present study, we provide new evidence of the functional relevance of this peptide through the association between the level of expression of VPAC1 in PBMCs and the patient's clinical status.

VPAC1 is expressed at slightly lower levels in the PBMCs of patients with EA than in those of healthy donors, although the difference is not significant. VPAC2, however, is expressed at higher levels in patients with EA. Using flow cytometry, Delgado et al [21] showed decreased

Table 2. Multivariate analysis of variables associated with VPAC1 expression during follow-up of patients with early arthritis.

	β Coeff.	95% CI	p-value
DAS28	-0.070	[-0.10–0.300]	0.000
Corticosteroids	-0.002	[-0.10–0.004]	0.483
DMARDs			
<i>None</i>	Ref.		
<i>Monotherapy</i>	0.080	[-0.003–0.170]	0.059
<i>Combined therapy</i>	0.220	[0.090–0.340]	0.001
Origin			
<i>Spain</i>	Ref.		
<i>South America</i>	0.140	[0.020–0.270]	0.025
<i>Eastern Europe</i>	0.290	[-0.270–0.850]	0.304

The longitudinal multivariate analysis was performed with data (mathematical transformation for VPAC1 expression: raised to 0.3) from 207 visits corresponding to the 79 rheumatoid arthritis patients with all information available for ≥ 2 visits. β Coeff.: β coefficient of the Wald test; CI: confidence interval; DAS28: 28-joint disease activity score; DMARD: disease-modifying antirheumatic drugs. The table shows all the variables reaching $p < 0.2$ in the bivariate analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0149141.t002

expression of VPAC1 in PBMCs from patients with RA, probably as a result of altered gene regulation, although no data were reported for RNA expression [21]. The increased expression of VPAC2 receptors shown here might reflect a compensating mechanism operating *in vivo*. In fact, the present study is the first to demonstrate a converse change in the expression of VPAC1 and VPAC2 in PBMCs during the course of EA.

Previous studies demonstrated polarization toward a Th1/Th17 response and exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the immune-inducible VPAC2 receptor [32, 33]. In addition, transgenic mice expressing VPAC2 display a shift in CD4 T-cell polarization towards a Th2 phenotype [33, 34]. Our findings indicate that lower expression of VPAC1 in PBMCs is correlated with an increase in VPAC2 expression that could be explained as an attempt to counteract the imbalance of Th1/17 and Th2 in RA. Indeed, in Th17-polarized cells from EA patients, expression of VPAC2 predominates over VPAC1 [35]. Moreover,

Table 3. Multivariate analysis of variables associated with VPAC2 expression during follow-up of patients with early arthritis.

	β Coeff.	95% CI	p-value
DAS28	-0.01	[-0.04–0.02]	0.540
Corticosteroids	-0.0002	[-0.01–0.01]	0.940
DMARDs			
<i>None</i>	Ref.		
<i>Monotherapy</i>	0.003	[-0.08–0.08]	0.946
<i>Combined therapy</i>	0.05	[-0.06–0.17]	0.367
Origin			
<i>Spain</i>	Ref.		
<i>South America</i>	0.001	[-0.11–0.12]	0.992
<i>Eastern Europe</i>	0.45	[-0.07–0.98]	0.090

The longitudinal multivariate analysis was performed with data from 210 visits corresponding to the 79 rheumatoid arthritis patients with all information available for ≥ 2 visits. β Coeff.: β coefficient of the Wald test; CI: confidence interval; DAS28: 28-joint disease activity score; DMARD: disease-modifying antirheumatic drugs. The table shows all the variables reaching $p < 0.2$ in the bivariate analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0149141.t003

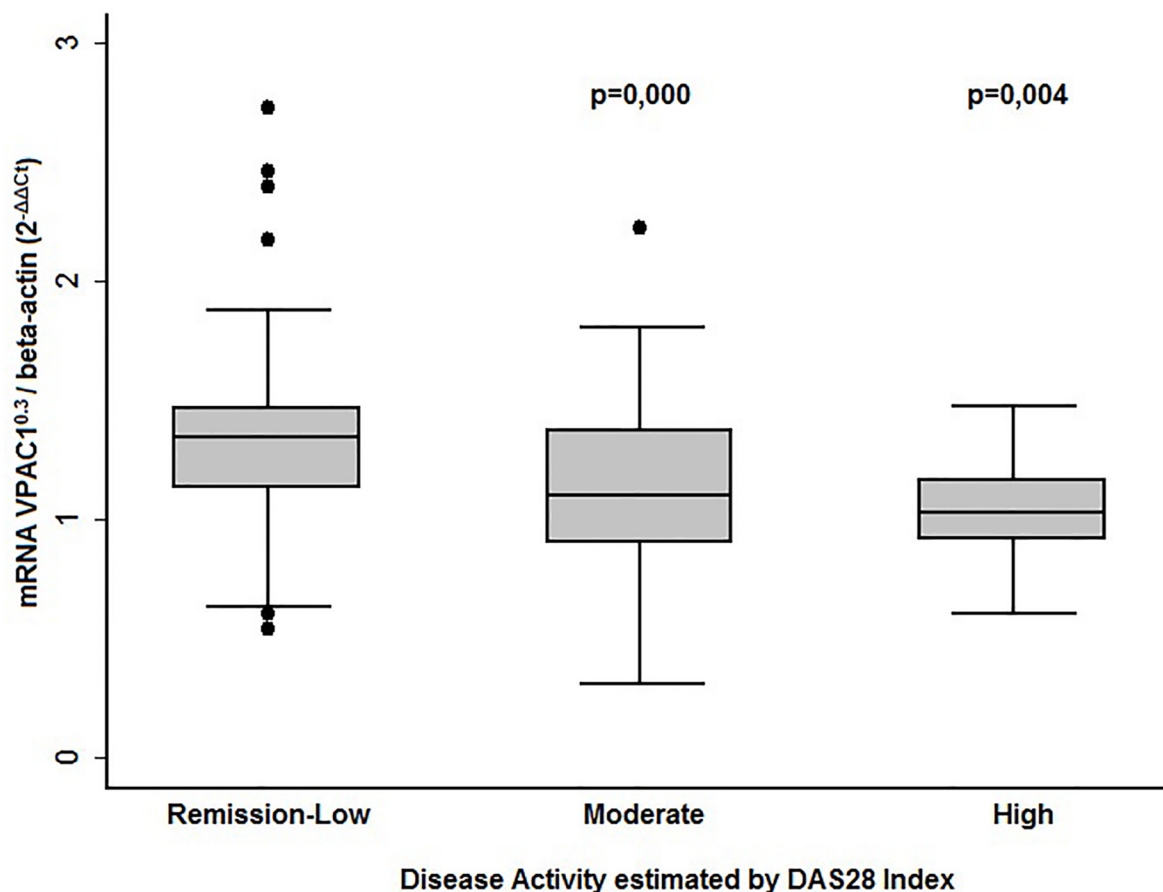


Fig 4. Correlation between VPAC1 gene expression levels and disease activity. Data are represented as the interquartile range (p75 upper edge of the box, p25 lower edge, p50 midline), p90 (line above the box) and p10 (line below the box). Mathematical transformation for VPAC1 expression: raised to 0.3. Dots represent outliers. Statistical significance was established using the Kruskal-Wallis test.

doi:10.1371/journal.pone.0149141.g004

VPAC2 is able to mediate anti-inflammatory effects when expression of VPAC1 is reduced [22]. Future studies will examine the functional relevance of the higher expression of VPAC2 receptors in the PBMCs of patients with EA and whether this constitutes a compensatory mechanism or is simply an event brought about by damage associated with chronic inflammation.

The sustained high expression of IL-6 is a key inducer of systemic inflammation in RA and is associated with disease activity [36]. In our cohort, expression of IL-6 decreased during follow-up, probably as a result of the effectiveness of disease-modifying antirheumatic drugs. Our

Table 4. Correlation between VPAC1 expression and global disease assessment.

	ESR		CRP		VPAC1	
	β Coeff.	p-value	β Coeff.	p-value	β Coeff.	p-value
GDAPa	0.182	0<0.001	0.331	<0.001	-0.219	0.002
GDAPh	0.268	<0.001	0.468	<0.001	-0.305	<0.001

Spearman's correlation test performed with quantitative variables GDAPa: global disease activity assessed by patient; GDAPh: global disease activity assessed by physician. β Coeff.: β coefficient of Spearman's test. Statistical significance was set at $p<0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0149141.t004

results reveal that more severe inflammation, seen as high levels of IL-6, is associated with lower expression of VPAC1 and, conversely, with increased expression of VPAC2. Interestingly, a major finding of the present study is that patients with a higher degree of disease activity show lower expression of VPAC1. In addition, expression of VPAC1 makes it possible to differentiate between patients with various degrees of clinical disease activity. VIP signaling through VPAC1 considerably inhibits the G1/S transition of the cell cycle in human T cells, and the expression of this receptor is down-regulated in activated T-cells [17, 18]. Thus, VPAC1 signaling appears to block the signal that causes its down-regulation and might be the reason why low expression of VPAC1 has been observed in cell lines and blasts from patients with leukemia [18]. Given that proliferative response and hyperactivity of CD4+ T cells are characteristics that contribute to the pathogenesis of RA, expression of VPAC1 could serve as an indicator of deregulated activation of the immune system. To date, we do not know whether changes in VPAC1 expression are a cause or a consequence of the disease, although our results suggest a protective role for this receptor in EA. The multiplicity and diversity of activities exerted when VPAC1 binds to VIP consistently supports this possibility. In fact, both animal and human models of RA have demonstrated that selective activation of VPAC1 is more effective for controlling the immune response than VPAC2 agonists [37]. Accordingly, treatment with a VPAC1 agonist, but not with a VPAC2 agonist, reduced the frequency of arthritis, ameliorated symptoms, and prevented joint damage in an experimental model of arthritis [7]. In addition, treatment with a VPAC1 agonist decreased the inflammatory response during progression of collagen-induced arthritis by down-regulating the production of various inflammatory mediators and reduced the presence of autoreactive Th1 cells in the joints [21].

The fact that patients treated with monotherapy or combined therapy exhibit higher levels of VPAC1 expression but not VPAC2 suggests that VPAC1 receptor regulation is probably sensitive to disease-modifying antirheumatic drugs, as shown for several cytokines and their receptors [38, 39]. Antirheumatic agents could act indirectly by modifying the profile of immune cell types bearing VPAC1/2 receptors within the population of PBMCs. In fact, combined therapy increased the number of lymphocytes and monocytes (S3 Fig) which was associated with increased expression of VPAC1 but it was not correlated with VPAC2 expression (S2 Table). However, the lymphocytes:monocytes ratio was not affected by prescribed treatments and no association was observed with VPACs receptors expression (S3 Fig). Moreover, anti-inflammatory agents could change the relative proportions of specific lymphocyte subpopulations expressing VPACs receptors. In this sense, it has been described that Th17 polarization induces a higher expression of both receptors in EA patients mainly of the VPAC2 receptor [35]. Thus, a shift in the relative levels of the different T cell subpopulations during treatment could eventually result in changes in the VPAC1 expression. Finally, DMARD might act directly by regulating the expression of VPAC1 receptor on lymphocytes and monocytes.

Therefore, VPAC1 could serve as an indicator for clinical observation of disease activity and also as a therapeutic target in RA.

Finally, our results reveal that expression of VPAC1 correlates with global disease activity as estimated by patients and physicians in much the same way as currently used biomarkers of disease activity. This observation is interesting, because the patient's perception has been repeatedly shown to have crucial predictive value [40]. Although patient perspectives *per se* are subjective, they will likely serve as a benchmark to improve not only traditional objective measures of disease activity, but also patient satisfaction [41].

The mechanisms involved in the regulation of the expression of VPAC1 in immune cells from patients with EA remain unknown. Although predisposition to RA has been associated with a haplotype in the VPAC1 3'-UTR [21], no evidence of an association with clinical variables has emerged. Ongoing and future studies investigating the molecular mechanisms

regulating VPAC1 are essential for better understanding of its role in inflammatory disease and autoimmunity.

In conclusion, patients with more severe inflammation and high disease activity show lower levels of VPAC1 expression associated with patient-reported impairment. Although the mechanisms of VPAC1 regulation have yet to be elucidated, emerging evidence supports the clinical relevance of VPAC1 expression in RA.

Supporting Information

S1 Appendix. Materials and Methods of Western blot analysis of VPAC1 receptor.
(DOC)

S1 Fig. Evolution of gene expression levels of VPAC1 and VPAC2 in PBMCs from EA patients with 3 or 4 visits. (A) and (B) Variation in gene expression levels of VPAC1 (panel A) and VPAC2 (panel B) receptors. Statistical significance was established using the Trend test and non-parametric posteriori test (Dunnett) for intergroup comparison.
(TIF)

S2 Fig. VPAC1 protein expression studied by Western Blot analysis of PBMCs lysates from patients with RA with differential DAS28 levels. A) Samples from a couple of patients in visit 1 with low and high DAS28 level, respectively. A representative example of two analyses with similar results is shown. B) Samples from one patient in two consecutive visits during the follow-up, after and before receiving treatment. In both panels protein bands were densitometrically analyzed and normalized against beta-actin intensity. Pictures are a representative example. ARC: Arthritis Register Code for each patient. V: Visit number. The protocol of PEARL study does not include storing samples for intracellular proteins analysis. Therefore, it was not possible to perform the protein analysis during the course of the disease in parallel to gene expression studies and it was only conducted on a few patient samples.
(TIF)

S3 Fig. Variations in the relative proportions of different cell populations of PBMCs related to the administration of combined therapy. A) Proportion of lymphocytes in patients with no treatment or with combined therapy. B) Proportion of monocytes in patients with no treatment or with combined therapy. C) Representation of the ratio lymphocytes/monocytes in patients with no treatment or with combined therapy. Statistical significance was established by means of a Kruskal-Wallis test: $p < 0.05$.
(TIF)

S1 Table. Ct Values of real-time PCR assay. Data are shown as the mean \pm standard deviation.
(DOC)

S2 Table. Association between VPAC1 and VPAC2 expression and cell population proportions in patients with combined therapy. The association was studied by means of a univariate GEE (generalized estimating equations method).
(DOC)

Acknowledgments

The authors are grateful to the patients of the EA Register and to the Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de la Princesa for recruiting healthy donors.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CM AMO RPG IG-Á. Performed the experiments: CM IVS RPG. Analyzed the data: CM AMO RPG IG-Á LP RG-V IVS YJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: AL AMO IG-Á RG-V. Wrote the paper: CM RPG IG-Á.

References

- Choy E, Taylor P, McAuliffe S, Roberts K, Sargeant I. Variation in the use of biologics in the management of rheumatoid arthritis across the UK. *Curr Med Res Opin.* 2012; 28:1733–1741. doi: [10.1185/03007995.2012.731388](https://doi.org/10.1185/03007995.2012.731388) PMID: [22978773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22978773/)
- van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van der Heijde DM, Te Meerman GJ, van Riel PL, Houtman PM, et al. The acute-phase response in relation to radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a prospective study during the first three years of the disease. *Br J Rheumatol.* 1993; 32 (Suppl 3):9–13. PMID: [8508266](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8508266/)
- Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LH, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Arthritis Rheum.* 2011; 63:573–586. doi: [10.1002/art.30129](https://doi.org/10.1002/art.30129) PMID: [21294106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21294106/)
- Combe B, Landewe R, Lukas C, Bolosiu HD, Breedveld F, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 2007; 66:34–45. PMID: [16396980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16396980/)
- Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:631–637. doi: [10.1136/ard.2009.123919](https://doi.org/10.1136/ard.2009.123919) PMID: [20215140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20215140/)
- Keystone EC, Smolen J, van Riel P. Developing an effective treatment algorithm for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51 (Suppl 5):v48–54.
- Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J, Delgado M. Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des.* 2001; 7:89–111. PMID: [11172702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11172702/)
- Gonzalez-Rey E, Anderson P, Delgado M. Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: a new approach for autoimmune therapy. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66 (Suppl 3):iii70–76. PMID: [17934101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17934101/)
- Delgado M, Ganea D. Anti-inflammatory neuropeptides: a new class of endogenous immunoregulatory agents. *Brain Behav Immun.* 2008; 22:1146–1151. doi: [10.1016/j.bbi.2008.06.001](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.06.001) PMID: [18598752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18598752/)
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Canas I, Palao G, Galindo M, et al. Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford).* 2004; 43:416–422.
- Gutierrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B, Martinez C, Gomariz RP, Pablos JL, et al. Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun.* 2008; 22:312–317. PMID: [17951026](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17951026/)
- Martinez C, Ortiz AM, Juarranz Y, Lamana A, Seoane IV, Leceta J, et al. Serum levels of vasoactive intestinal peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS One.* 2014; 9:e85248. doi: [10.1371/journal.pone.0085248](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085248) PMID: [24409325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24409325/)
- Jimeno R, Gomariz RP, Garin M, Gutierrez-Canas I, Gonzalez-Alvaro I, Carrion M, et al. The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP. *J Mol Med (Berl).* 2015; 93:457–467.
- Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutierrez-Canas I, Rosignoli F, et al. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7:R1034–1045. PMID: [16207319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16207319/)
- Ganea D, Hooper KM, Kong W. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases. *Acta Physiol (Oxf).* 2015; 213:442–452.
- Couvineau A, Laburthe M: VPAC receptors. structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol.* 2012; 166:42–50. doi: [10.1111/j.1476-5381.2011.01676.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01676.x) PMID: [21951273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21951273/)
- Lara-Marquez M, O'Dorisio M, O'Dorisio T, Shah M, Karacay B. Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells. *J Immunol.* 2001; 166:2522–2530. PMID: [11160313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11160313/)
- Dorsam GP, Benton K, Failing J, Batra S. Vasoactive intestinal peptide signaling axis in human leukemia. *World J Biol Chem.* 2011; 2:146–160. doi: [10.4331/wjbc.v2.i6.146](https://doi.org/10.4331/wjbc.v2.i6.146) PMID: [21765981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21765981/)

19. Hauk V, Fraccaroli L, Grasso E, Eimon A, Ramhorst R, Hubscher O, et al. Monocytes from Sjogren's syndrome patients display increased vasoactive intestinal peptide receptor 2 expression and impaired apoptotic cell phagocytosis. *Clin Exp Immunol*. 2014; 177:662–670. doi: [10.1111/cei.12378](https://doi.org/10.1111/cei.12378) PMID: [24827637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827637/)
20. Sun W, Hong J, Zang YC, Liu X, Zhang JZ. Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis. *Int Immunol*. 2006; 18:1691–1700. PMID: [17077178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17077178/)
21. Delgado M, Robledo G, Rueda B, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, et al. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:1010–1019. doi: [10.1002/art.23482](https://doi.org/10.1002/art.23482) PMID: [18383379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18383379/)
22. Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Santiago B, Carrion M, Pablos JL, Gomariz RP. Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:1086–1095. doi: [10.1002/art.23403](https://doi.org/10.1002/art.23403) PMID: [18383383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18383383/)
23. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995; 38:44–48. PMID: [7818570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7818570/)
24. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010; 62:2569–2581. doi: [10.1002/art.27584](https://doi.org/10.1002/art.27584) PMID: [20872595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20872595/)
25. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31:315–324. PMID: [3358796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3358796/)
26. Nishimoto N, Kishimoto T: Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006; 2:619–626. PMID: [17075601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17075601/)
27. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Seoane IV, Garcia-Vicuna R, Martinez C, Gomariz RP. Biomarkers predicting a need for intensive treatment in patients with early arthritis. *Curr Pharm Des*. 2015; 21:170–181. PMID: [25163741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25163741/)
28. Kirwan JR, Hewlett SE, Heiberg T, Hughes RA, Carr M, Hehir M, et al. Incorporating the patient perspective into outcome assessment in rheumatoid arthritis—progress at OMERACT 7. *J Rheumatol*. 2005; 32:2250–2256. PMID: [16265712](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16265712/)
29. Castrejon I, Ortiz AM, Garcia-Vicuna R, Lopez-Bote JP, Humbria A, Carmona L, et al. Are the C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rate equivalent when estimating the 28-joint disease activity score in rheumatoid arthritis? *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26:769–775. PMID: [19032807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19032807/)
30. Centola M, Cavet G, Shen Y, Ramanujan S, Knowlton N, Swan KA, et al. Development of a multi-biomarker disease activity test for rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2013; 8:e60635. doi: [10.1371/journal.pone.0060635](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060635) PMID: [23585841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23585841/)
31. Carrion M, Juarranz Y, Perez-Garcia S, Jimeno R, Pablos JL, Gomariz RP, et al. RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:1626–1636. doi: [10.1002/art.30294](https://doi.org/10.1002/art.30294) PMID: [21337319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21337319/)
32. Goetzl EJ, Voice JK, Shen S, Dorsam G, Kong Y, West KM, et al. Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for vasoactive intestinal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:13854–13859. PMID: [11698667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11698667/)
33. Tan YV, Abad C, Wang Y, Lopez R, Waschek JA. VPAC2 (vasoactive intestinal peptide receptor type 2) receptor deficient mice develop exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis with increased Th1/Th17 and reduced Th2/Treg responses. *Brain Behav Immun*. 2015; 44:167–175. doi: [10.1016/j.bbi.2014.09.020](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.09.020) PMID: [25305591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25305591/)
34. Voice JK, Grinninger C, Kong Y, Bangale Y, Paul S, Goetzl EJ. Roles of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the expression of different immune phenotypes by wild-type mice and T cell-targeted type II VIP receptor transgenic mice. *J Immunol*. 2003; 170:308–314. PMID: [12496414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496414/)
35. Jimeno R, Leceta J, Garin M, Ortiz AM, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, et al. Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect. *J Leukoc Biol*. 2015; 98:257–269. doi: [10.1189/jlb.3A0714-327R](https://doi.org/10.1189/jlb.3A0714-327R) PMID: [25957307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25957307/)
36. Shimamoto K, Ito T, Ozaki Y, Amuro H, Tanaka A, Nishizawa T, et al. Serum interleukin 6 before and after therapy with tocilizumab is a principal biomarker in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2013; 40:1074–1081. doi: [10.3899/jrheum.121389](https://doi.org/10.3899/jrheum.121389) PMID: [23637318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23637318/)
37. Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP, et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2002; 80:16–24.

38. Zhao PW, Jiang WG, Wang L, Jiang ZY, Shan YX, Jiang YF. Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF-alpha, IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2014; 9:e95346. doi: [10.1371/journal.pone.0095346](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095346) PMID: [24788826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24788826/)
39. Eriksson C, Rantapaa-Dahlqvist S, Sundqvist KG. Changes in chemokines and their receptors in blood during treatment with the TNF inhibitor infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2013; 42:260–265. doi: [10.3109/03009742.2012.754937](https://doi.org/10.3109/03009742.2012.754937) PMID: [23379516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23379516/)
40. Heiberg T, Kvien TK, Mowinckel P, Aletaha D, Smolen JS, Hagen KB. Identification of disease activity and health status cut-off points for the symptom state acceptable to patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67:967–971. PMID: [17965118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17965118/)
41. Aletaha D, Funovits J, Ward MM, Smolen JS, Kvien TK. Perception of improvement in patients with rheumatoid arthritis varies with disease activity levels at baseline. *Arthritis Rheum*. 2009; 61:313–320. doi: [10.1002/art.24282](https://doi.org/10.1002/art.24282) PMID: [19248136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19248136/)

Revisión

Biomarkers Predicting a Need for Intensive Treatment in Patients with Early Arthritis

González-Álvaro I, Ortiz AM, **Seoane IV**, García-Vicuña R, Martínez C, Gomariz RP. *Curr Pharm Des.* **2015**;21(2):170-81

Biomarkers Predicting a Need for Intensive Treatment in Patients with Early Arthritis

I. González-Álvaro^{1,*}, A.M^a. Ortiz¹, I.V. Seoane², R. García-Vicuña¹, C. Martínez³ and R.P. Gomariz²

¹Rheumatology Service, Hospital Universitario de La Princesa, IIS Princesa, Madrid, Spain; ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ³Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract: The heterogeneous nature of rheumatoid arthritis (RA) complicates early recognition and treatment. In recent years, a growing body of evidence has demonstrated that intervention during the window of opportunity can improve the response to treatment and slow—or even stop—irreversible structural changes. Advances in therapy, such as biologic agents, and changing approaches to the disease, such as the *treat to target* and *tight control* strategies, have led to better outcomes resulting from personalized treatment to patients with different prognostic markers. The various biomarkers identified either facilitate early diagnosis or make it possible to adjust management to disease activity or poor outcomes. However, no single biomarker can bridge the gap between disease onset and prescription of the first DMARD, and traditional biomarkers do not identify all patients requiring early aggressive treatment. Furthermore, the outcomes of early arthritis cohorts are largely biased by the treatment prescribed to patients; therefore, new challenges arise in the search for prognostic biomarkers. Herein, we discuss the value of traditional and new biomarkers and suggest the need for intensive treatment as a new surrogate marker of poor prognosis that can guide therapeutic decisions in the early stages of RA.

Keywords: Early arthritis, biomarker, IL-15, VIP.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disorder characterized by chronic inflammation of diarthrodial joints leading to joint destruction and, therefore, severe disability. In addition, the prevalence of comorbid conditions is high, and systemic inflammatory manifestations are common in patients with poorly controlled long-term disease [1, 2]. Consequently, RA causes impaired quality of life, loss of working-hours due to disability, high direct and indirect care costs, and decreased life expectancy [1, 3-11]. However, during the last 20 years, rheumatologists have observed a change in the clinical course of patients with RA attended at their clinics [12]. Improved diagnostic tests and management paradigms have led to better disease control. One of the most striking and dramatic improvements in the management of RA is the availability of biologic agents. Furthermore, changes in the mentality of rheumatologists, who no longer consider the disease benign, have led to more favorable outcomes in patients with RA [13]. Some of these new models are discussed below.

WINDOW OF OPPORTUNITY

The “window of opportunity” concept is a key component of current management of RA. During the late 1980s, rheumatologists realized that available treatment strategies were unable to control the disease adequately in many patients. In 1989, Healey and Wilks proposed discontinuing the pyramid strategy and treating patients more efficiently from the earliest stages [14, 15]. Although some authors disagree with a more proactive approach [16], ie, prescription of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD), the paper by McCarty entitled “Suppress rheumatoid inflammation early and leave the pyramid to the Egyptians” encouraged many rheumatologists to adopt the new approach [17]. During the 1990s, a growing body of evidence indicated that treating RA earlier would lead to better outcomes [18]. This notion was further supported in 2000 by Anderson *et al.* [19], whose meta-analysis of clinical trials investigating various DMARDs showed that disease duration was a critical factor for worse rate of response, irrespective

of the drug prescribed. The authors anticipated that the window of opportunity could be open during the first 2 years of the disease. However, during the first decade of this century, several clinical trials and cohort studies suggested that the window of opportunity may close progressively around the onset of symptoms; consequently, rheumatologists moved the decision to start DMARDs from <1-2 years of symptoms (early RA) to <12 weeks of symptoms (very early RA) [20, 21]. At the same time, it became clear that new diagnostic criteria were necessary to classify patients when disease duration is <12 weeks and/or no typical radiological findings are present [22]. These criteria for classification of early RA were published in 2010 [23]. Furthermore, many rheumatologists consider that some patients not fulfilling the 2010 criteria could require DMARDs to avoid progression to RA [24-26]. The term “undifferentiated arthritis” had been used during the 1980s to refer to a subpopulation of patients that falls within the spectrum of spondyloarthritis. However, during the first decade of this century, undifferentiated arthritis was more commonly used to refer to a disease that could be considered a pre-RA disorder, at least in a subset of patients [27-30].

These findings led rheumatologists to treat RA patients with DMARDs as soon as possible in an attempt to achieve remission or at least the best possible response. However, the lag time between onset of symptoms and prescription of the first DMARD does not depend only on the rheumatologist. In 1999 in Spain, the emAR Study revealed a median lag time to first DMARD of 19 months [31]. The reasons for such a long lag time were related to patients (years of schooling and other sociodemographic variables), primary care physicians, and the organization of rheumatology services [31, 32]. During the first decade of this century, the Spanish Society of Rheumatology (SER) promoted a series of media campaigns to improve awareness of RA among the general population. Furthermore, in 2004, the SER supported nationwide implementation of early arthritis clinics (EAC) through the SERAP program. This initiative was designed to facilitate closer cooperation between primary care physicians and rheumatology departments so that patients with potential early arthritis had fast access to treatment [33]. The results of this huge effort were excellent. The Rheumatology Service of Hospital Universitario de La Princesa (HUP) also participated in the study, although our EAC had already been run-

*Address correspondence to this author at the Rheumatology Service, Hospital Universitario de La Princesa, IIS Princesa, Madrid, Spain; E-mail: isidoro.ga@ser.es

ning for 4 years. During the last 13 years, the median lag time to prescription of the first DMARD in our unit has decreased progressively from 26 to 3 months Fig. (1A). In addition, we observed a trend towards better control of disease activity during the first 2 years of follow-up compared with before the implementation of the EAC Fig. (1B). This finding in a local population was confirmed throughout Spain in the SERAP program [34].

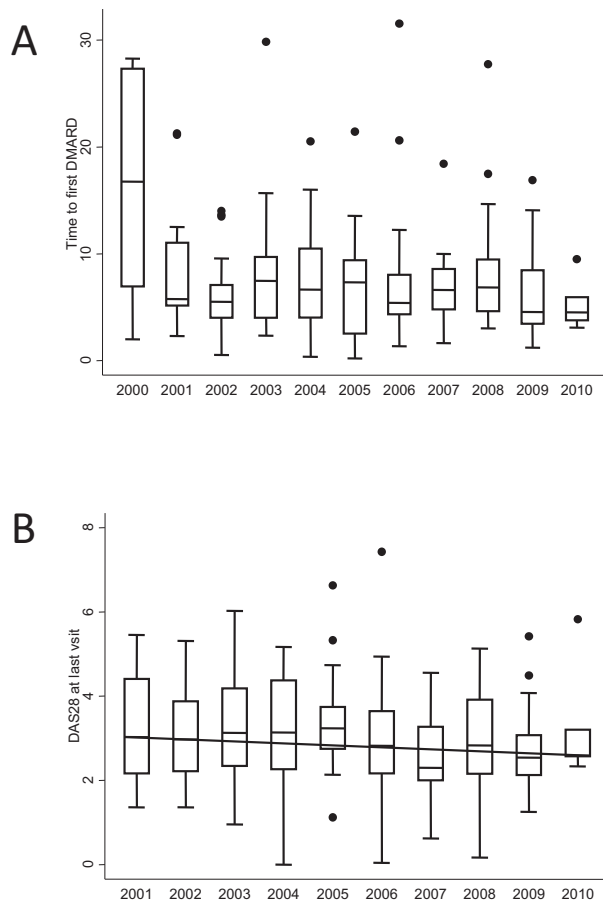


Fig. (1). Benefits of establishing the Early Arthritis Clinic at Hospital Universitario La Princesa. **A)** Lag time to prescription of the first disease-modifying antirheumatic drug (DMARD). **B)** Disease activity after 2 years of follow-up. Data are presented as the interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p95 (line above the box) and p5 (line below the box), of the lag time from the date of onset of symptoms to the date of prescription of the first DMARD (**A**) or the DAS28 at the end of the second year of follow-up (**B**). Dots represent the outliers. The solid black line in figure B represents the trend of medians over the years.

TREAT TO TARGET

The other key element in achieving optimal outcome for RA patients is the “treat to target” strategy. Various studies, such as FIN-RAco, TICORA, CAMERA, and BeSt, have shown that, irrespective of the therapeutic approach used, patient outcomes can be improved when treatment is adjusted to achieve a pre-established goal [35-38]. Essentially, treat to target involves stepping up or adjusting treatment with glucocorticoids or DMARDs (whether synthetic or biologic) until the therapeutic objective is achieved. Intensification is based on a predefined schedule analyzed in clinical trials that have confirmed this approach [35, 38, 39]. Nevertheless, in daily practice, therapeutic strategies based on management

protocols are not the rule, and prescription of DMARDs varies widely depending on the patient’s and the physician’s preferences [40-42]. In order to ensure acceptance by rheumatologists of the treat to target strategy, an international task force formulated 10 recommendations for better application of the approach in daily practice, leading to more accurate control of disease activity [43]. Despite these efforts, implementation is challenging, and the rheumatologists most likely to use the strategy are those involved in the management of EACs and in research.

RA IS A HETEROGENEOUS DISEASE

Despite a widespread trend toward applying earlier and more aggressive treatment in patients with RA, rheumatologists are aware that the heterogeneous nature of the disease means that a substantial proportion of patients could achieve spontaneous remission. This is especially true of patients with early arthritis, who achieve remission rates ranging from 10% to 50% [44]. The heterogeneous genetic background underlying the broad clinical spectrum of RA is addressed elsewhere in the review issue by Rodríguez *et al.*, who believe that the wide range of responses to treatment is probably due to genetic variability and environmental factors. Therefore, given that patients outside the clinical trial setting show considerable variability in age at onset, number of comorbid conditions, socioeconomic status, and lifestyle, application of a pre-established therapeutic schedule to every patient attended at an EAC does not seem appropriate. It would be advantageous to develop composite tools/algorithms combining sociodemographic items with biological markers in order to customize the treat to target strategy, thus avoiding unnecessary therapy and undesirable toxicity in those patients with a low risk of developing severe disease, but allowing rapid control in those patients with a poor prognosis. However, testing the prognostic value of biomarkers in untreated cohorts merely to study their impact on the natural history of the disease is subject to ethical limitations. Thus, at present, the outcomes of early arthritis cohorts are largely biased by the treatment prescribed.

NEED FOR TREATMENT AS A SURROGATE OUTCOME FOR DISEASE SEVERITY IN RA

The changes in the management of RA described above are difficult to assess when observational studies searching for biomarkers of poor prognosis are based on populations attended at an EAC. This concern had already been raised in 2003 by Boers, who suggested that confounding by indication may decrease the effect of prognostic indicators on outcome (either disease activity or radiological progression) if physicians are aware of the importance of the biomarker [45]. The effect of confounding by indication is clearly seen in our early arthritis population, where physicians stressed the relevance of anticitrullinated protein antibody (ACPA) positivity. Our EAC has no pre-established therapeutic protocol, and when it was established in September 2000, the prognostic value of ACPA for poor outcome had already been proposed [46, 47]. Therefore, as shown in Fig. (2A), although ACPA-positive patients showed slightly but significantly higher baseline scores in the Disease Activity Score measured in 28 joints (DAS28), these differences disappeared during the 2-year follow-up. In addition, no significant differences were observed in radiological progression during these 2 years Fig. (2B).

To overcome this bias, several groups analyzed variables associated with treatment. Verstappen *et al.* reported that failure of the first DMARD is a marker of the need for biologic agents in patients with early inflammatory polyarthritis [48]. These authors used therapeutic variables as prognostic factors of outcomes. Other possible therapeutic outcomes could be of the need for combined therapy with DMARDs or the classic cumulative dose of glucocorticoids.

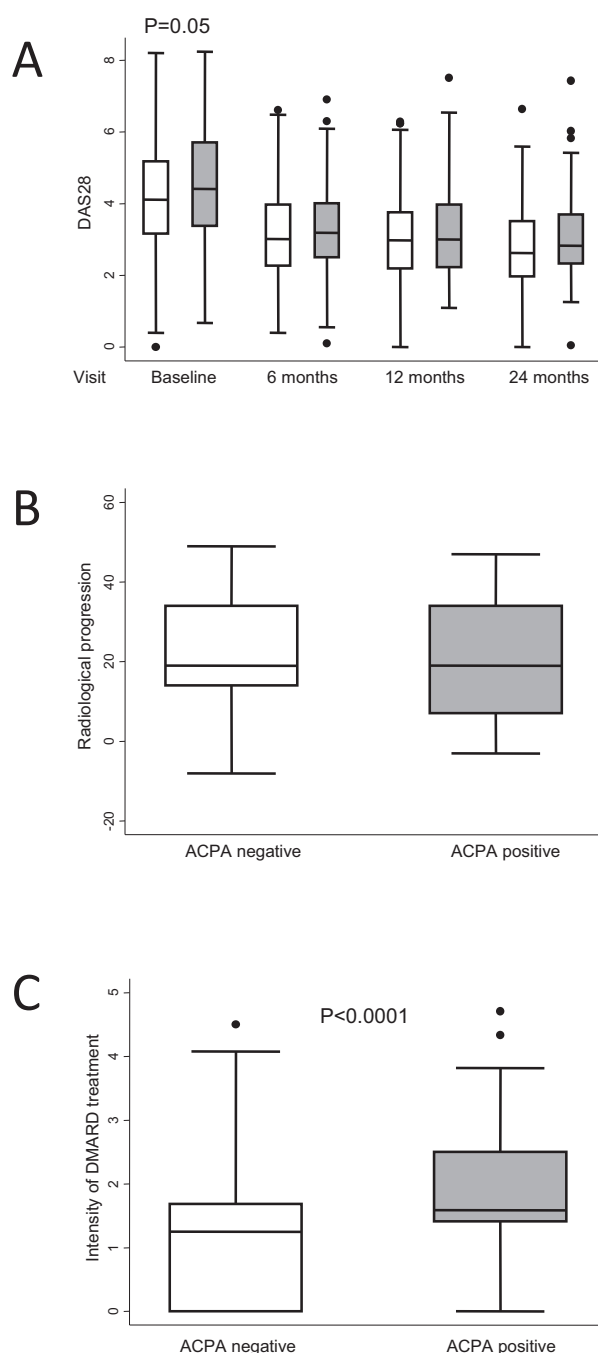


Fig. (2). Differences in clinical course between patients with positive and negative anticitrullinated peptide antibody (ACPA) in the Early Arthritis Clinic at Hospital Universitario La Princesa. **A**) Disease activity assessed using DAS28. White boxes represent ACPA-negative patients ($n = 168$); grey boxes represent ACPA-positive patients ($n = 136$). **B**) Radiological progression was estimated as the variation in the Sharp score with the modification of van der Heijde between baseline and the 24-month visit ($n = 97$). **C**) Intensity of treatment with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) was estimated as described in the section “Need for treatment as a surrogate outcome for disease severity in RA” ($n = 304$). Data are presented as the interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 mid-line), as well as the p95 (line above the box) and p5 (line below the box), of the respective variables. Dots represent outliers. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test.

In our EAC registry, we defined a variable termed “intensity of DMARD treatment” (IDT), which represents the cumulative prescription of all drugs (whether synthetic or biologics) during the first 2 years of follow-up weighted by their effectiveness, as follows:

$$\text{IDT} = [(1 \times \text{number of days with antimalarials}) + (1.5 \times \text{number of days with methotrexate, leflunomide, sulphasalazine, parenteral gold salts}) + (2 \times \text{number of days with biologic therapy})] / \text{number of days of follow-up} [49].$$

The factor used to customize the weight of the different drugs was based on the meta-analysis by Felson, who suggested that methotrexate, sulfasalazine, and gold salts are more efficacious than antimalarials [50] and similar to leflunomide [51]. In addition, it is commonly accepted that biologics represent a step beyond synthetic DMARDs.

Using this tool, we observed that ACPA-positive patients received more intense treatment with DMARDs than ACPA-negative patients Fig. (2C). Therefore, measuring the intensity of treatment could be a useful surrogate marker of disease severity in populations that routinely received early treat to target strategies in an EAC. In fact, the 2010 criteria for classification of RA were based on a similar concept, where initiating methotrexate within the first 12 months of follow-up was the gold standard for classification of RA [23].

Obviously, prescription of DMARDs could be biased by factors such as age, educational or socioeconomic status, physician preferences, and features of the health system. However, the analysis of this variable can be easily adjusted for these confounders, and physicians at hospitals with an EAC are usually less heterogeneous in their prescription habits.

BIOMARKERS OF THE NEED FOR INTENSIVE TREATMENT

Sociodemographic Data

Female gender has traditionally been considered an indicator of poor prognosis in RA, since women display higher disease activity scores Fig. (3A) [1, 52]. However, some authors consider that this finding could be due to a bias in the tools used for the assessment of disease activity [53, 54]. In this regard, we recently described a new composite index, the HUPI (Hospital Universitario La Princesa Index), which prevents gender bias associated with tender joints and erythrocyte sedimentation rate [55]. Nevertheless, slightly higher disease activity scores are seen in women, even with this index Fig. (3B). We propose that female gender should continue to be considered an indicator of poor prognosis, since in our early arthritis population, women display similar or higher disease activity (depending on the indexes) despite receiving more intensive DMARD therapy Fig. (3C). This finding was associated with a trend towards more frequent prescription of combined therapy to women than to men (47.7% vs 38%, $p=0.26$) and a significantly higher percentage of tumor necrosis factor (TNF) blockers in women (11.8% vs 2.9%; $p=0.046$).

Age at disease onset is also a controversial prognostic factor. Traditionally, late onset had been associated with less severe disease [56]. However, in 1999, Pease *et al.* reported that patients with late onset RA in an EAC had a clinical course comparable to that of patients with early onset RA in terms of disability and presence of erosions [56]. In addition, more frequent prescription of glucocorticoids and less frequent prescription of DMARDs were also noted in the late onset population. The latter finding was confirmed in a recent German study in which DMARDs (synthetic or biologic) were prescribed less frequently in patients aged >65 years [57]. This finding could be explained by the higher prevalence of comorbid conditions in elderly patients, which leaves rheumatologists more reluctant to intensify treatment. In our EAC registry, patients

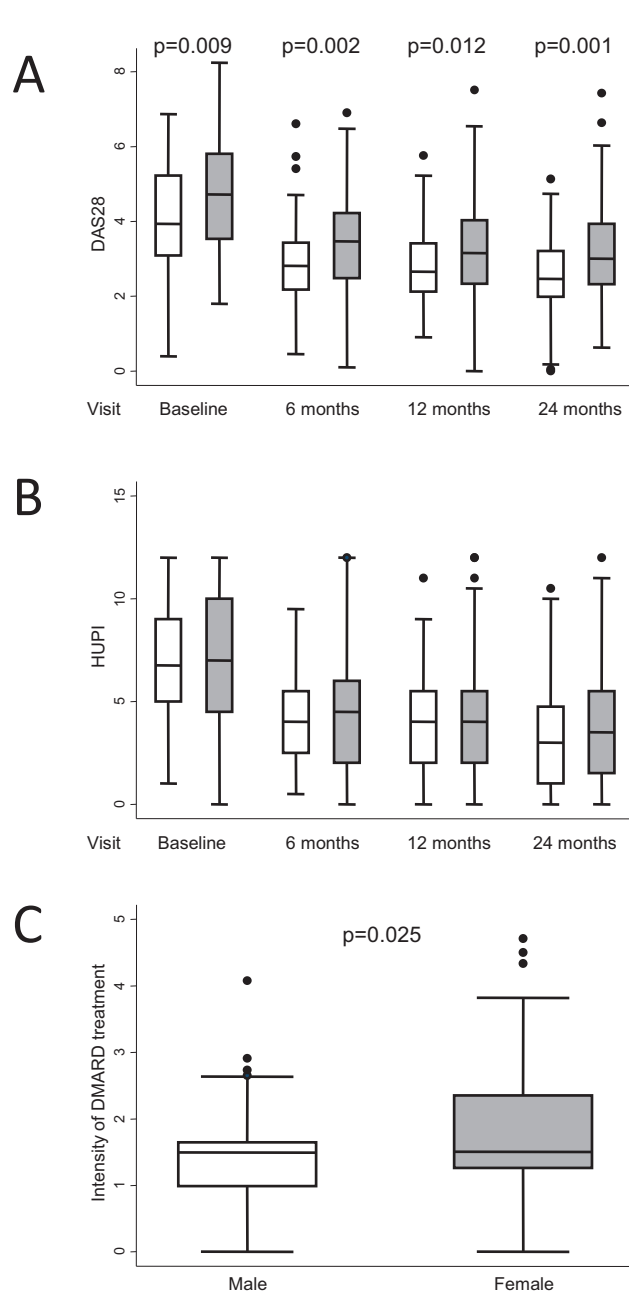


Fig. (3). Differences in clinical course by gender (female, grey boxes; male, white boxes) in the population of the Early Arthritis Clinic at Hospital Universitario La Princesa. **A)** Disease activity assessed by DAS28 ($n = 285$, 230, 238, and 248 patients at baseline, 6, 12, and 24 months, respectively). **B)** Disease activity assessed using the Hospital Universitario La Princesa Index (HUPI; $n = 304$, 236, 251, and 256 patients at baseline, 6, 12, and 24 months, respectively). **C)** The intensity of treatment with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) was estimated as described in the section "Need for treatment as a surrogate outcome for disease severity in RA" ($n = 304$). Data are presented as the interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p95 (line above the box) and p5 (line below the box), of the respective variables. Dots represent outliers. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test.

>65 years displayed higher disease activity scores at baseline and after a 2-year follow-up Fig. (4A). Regarding DMARDs, the median IDT values were similar in patients >65 years compared to

either patients aged <45 years or to the subset aged 45-65 years Fig. (4B). However, few elderly patients received very intensive DMARD treatment (IDT>2 Units); Fig. (4B), probably reflecting less frequent prescription of combined therapy in this population (33%) than in patients aged 45-65 years (48%) and patients aged <45 years (53%). Accordingly, in the Norfolk Arthritis Register, Verstappen *et al.* recently reported younger age to be a predictor for prescription of biologics (48) and older age to be associated with reduced use of biologic agents in the US (58). Taken together, these findings suggest that aggressive therapeutic approaches such as combined therapy or biologics are avoided in elderly patients in an attempt to prevent adverse events. In contrast with this safety-guided management, patients aged >65 years received more glucocorticoids, both in our practice Fig. (4C) and in reports from other European cohorts [56]. However, glucocorticoids have also been associated with an increased risk of infection in elderly patients [59-61]. Therefore, this treatment schedule should be used with caution in elderly people, and further studies should be performed to determine which treatments carry an increased risk for patients aged >65 years.

Finally, other sociodemographic factors associated with poor prognosis or worse response to treatment are educational level, smoking, and marital status [62]. We did not find clearly worse outcomes of RA associated with these variables, except for a lower cumulative dose of glucocorticoids in patients with a high educational level.

Variables Associated with RA

The characteristics of RA at onset, such as baseline DAS28 or Health Assessment Questionnaire (HAQ) scores, have been proposed as predictors of subsequent disease progress. However, baseline DAS28 remains a controversial prognostic marker of disease severity in the long term. In fact, as reported by Emery and Dorer, a low DAS28 at the beginning of treatment with TNF blockers could be a marker for achieving remission according to the EULAR criteria, whereas a high DAS28 could be a marker for achieving a response according to the ACR criteria [63]. In addition to this discrepancy, our registry data show that higher disease activity at baseline correlates with higher disease activity after 2 years of follow-up, irrespective of the index used Fig. (5A,B). Furthermore, we obtained these results even though patients with moderate or high disease activity at baseline were prescribed more intensive DMARD therapy during these 2 years Fig. (5C,D).

The usefulness of the baseline HAQ score as a predictor of poor prognosis is more complex to analyze, since age and comorbid conditions have a considerable impact on the progress of the score [64-66]. This might be the reason why a high HAQ score is a good predictor of mortality in RA [13]. Nevertheless, as the baseline HAQ score showed an acceptable correlation with DAS28 after 2 years Fig. (6A), those patients with a baseline HAQ score >1.5 required significantly more intensive DMARD therapy than those with a baseline HAQ ≤ 1.5 Fig. (6B). However, when the age-stratified analysis was performed, a baseline HAQ >1.5 only predicted higher IDT values in patients younger than 45 years Fig. (6C). This finding highlights the need for complex analysis involving adjustment for confounding or modifying variables when searching for biomarkers to predict poor prognosis.

Serum Biomarkers

Practical biomarkers must be both accurate and feasible [67]. In this regard, detection in serum enables a biomarker to be tested in large populations and become widely used. Such is the case of rheumatoid factor (RF), which has been largely considered a marker of poor prognosis. In recent decades, ACPA testing has been shown to improve the diagnostic and prognostic yield of RA, mostly in patients who test negative for RF [2]. The predictive

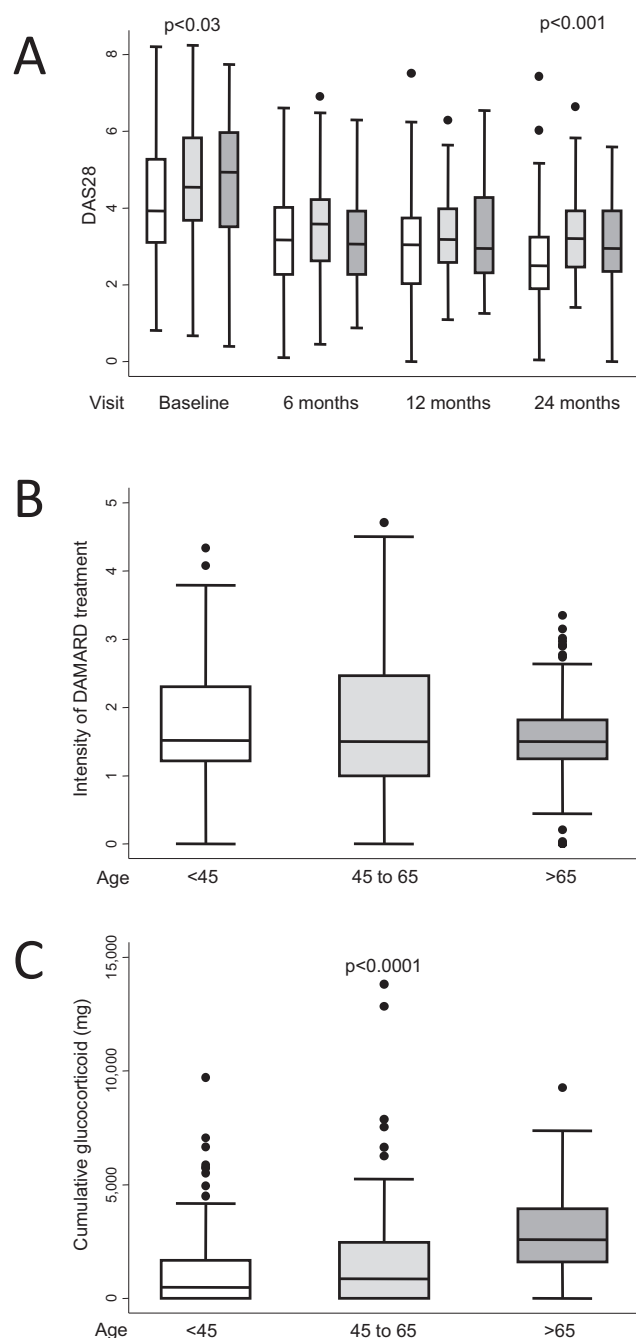


Fig. (4). Differences in clinical course by age (white boxes, age ≤ 45 years; light grey 45–65 years; dark grey, >65 years) in the population of the Early Arthritis Clinic at Hospital Universitario La Princesa. **A)** Disease activity assessed by DAS28 ($n = 285, 230, 238$, and 248 patients at baseline, 6, 12, and 24 months respectively). **B)** The intensity of treatment with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) was estimated as described in the section “Need for treatment as a surrogate outcome for disease severity in RA” ($n = 304$). **C)** Cumulative dose of glucocorticoids during the 2 years of follow-up ($n = 304$). Data are presented as the interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p95 (line above the box) and p5 (line below the box), of the respective variables. Dots represent outliers. Statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis test.

value of both biomarkers increases when high levels are detected; this concept has been included in the 2010 RA classification criteria [23]. As previously mentioned, ACPA positivity has become a reli-

able marker of poor outcome that prompts clinicians to intensify therapeutic efforts Fig. (2C), including prescription of biologics [48], which can result in improved outcomes Fig. (2A,B). Those findings stand in contrast to the poor outcome of ACPA-positive patients in historic cohorts of RA and support evidence that the search for risk factors in current early arthritis cohorts remains a challenge, since a single variable rarely provides a reliable estimation of prognosis. More accurate statistical strategies based on a multivariate approach are needed to highlight new prognostic biomarkers.

In addition to autoantibodies, cytokines are potential biomarkers that can be measured in serum. For the last 10 years, our Unit has been involved in the study of the predictive value of serum cytokine levels when assessing the need for treatment or the response to drugs.

Our first publication in this field analyzed the receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) [68]. The balance between these 2 molecules regulates osteoclast activation, which is an essential feature in RA bone erosions. Higher serum and tissue levels of both proteins have been described in RA patients than in healthy controls [69, 70]. In addition, the baseline RANKL/OPG ratio had been reported to predict radiological progression in early arthritis [71]. In view of the major effect of TNF blockers in arresting radiological damage in RA patients, we decided to study whether the levels of these cytokines could predict the response to pharmacological TNF blockade. TNF blockers did not decrease total serum RANKL levels, although a significant decrease in OPG levels was observed [68]. Interestingly, lower baseline serum levels of both total RANKL and the RANKL/OPG ratio were associated with achieving remission after 3 and 7 months of treatment [68]. One of the concerns with this biomarker is the fact that several variables, such as gender, age, and disease activity, can affect both RANKL levels and the assessment of response. Nevertheless, multivariate logistic regression analysis showed that after adjustment for gender, age, and baseline DAS28, lower levels of RANKL in serum were predictive of remission after prescription of TNF blockers [68]. Therefore, we studied the potential correlation between RANKL or the RANKL/OPG ratio and greater need for treatment in patients with early arthritis. A slight positive correlation was observed between baseline serum RANKL/OPG ratio and the variable IDT ($r = 0.16$; $p = 0.14$), as well as a trend toward higher baseline values for this variable in patients requiring DMARDs than in those managed without these drugs, although no significant differences were recorded.

A second molecule, interleukin (IL) 15 has been researched in-depth by our group. IL15 is involved in several steps of the pathogenesis of RA, ranging from activation of Th17 cells to induce IL17 production [72–75] to modulation of intercellular contacts driving TNF production [76–78]. It may also be involved in the survival and activation of neutrophils, B cells, and NK cells [79–81]. In addition, IL15 has been associated with osteoclastogenesis and, therefore, with bone erosion in RA [82–84]. Knevel *et al.* reported that genetic variants in the *IL15* gene are associated with differences in the radiological progression of patients with RA [85]. The possible mechanism underlying this association is the link between IL15, IL17, and RANKL, a relationship that we proposed in response to the article by Knevel *et al.*. Furthermore, blockade of IL15 has proven to prevent collagen-induced arthritis in mice [86]. Less impressive results were observed in human trials, where only a subpopulation of RA patients achieved considerable improvement [87]. A possible explanation for this disappointing result comes from the observation that dysregulation of IL15 production is observed in $<30\%$ of patients with RA [88]. Interestingly, patients with increased serum levels of IL15 showed a greater need for treatment, which was assessed using IDT (see above) [49]. As proposed in the Introduction, these findings reinforce the challenge of discovering new prognostic biomarkers in current early arthritis cohorts because

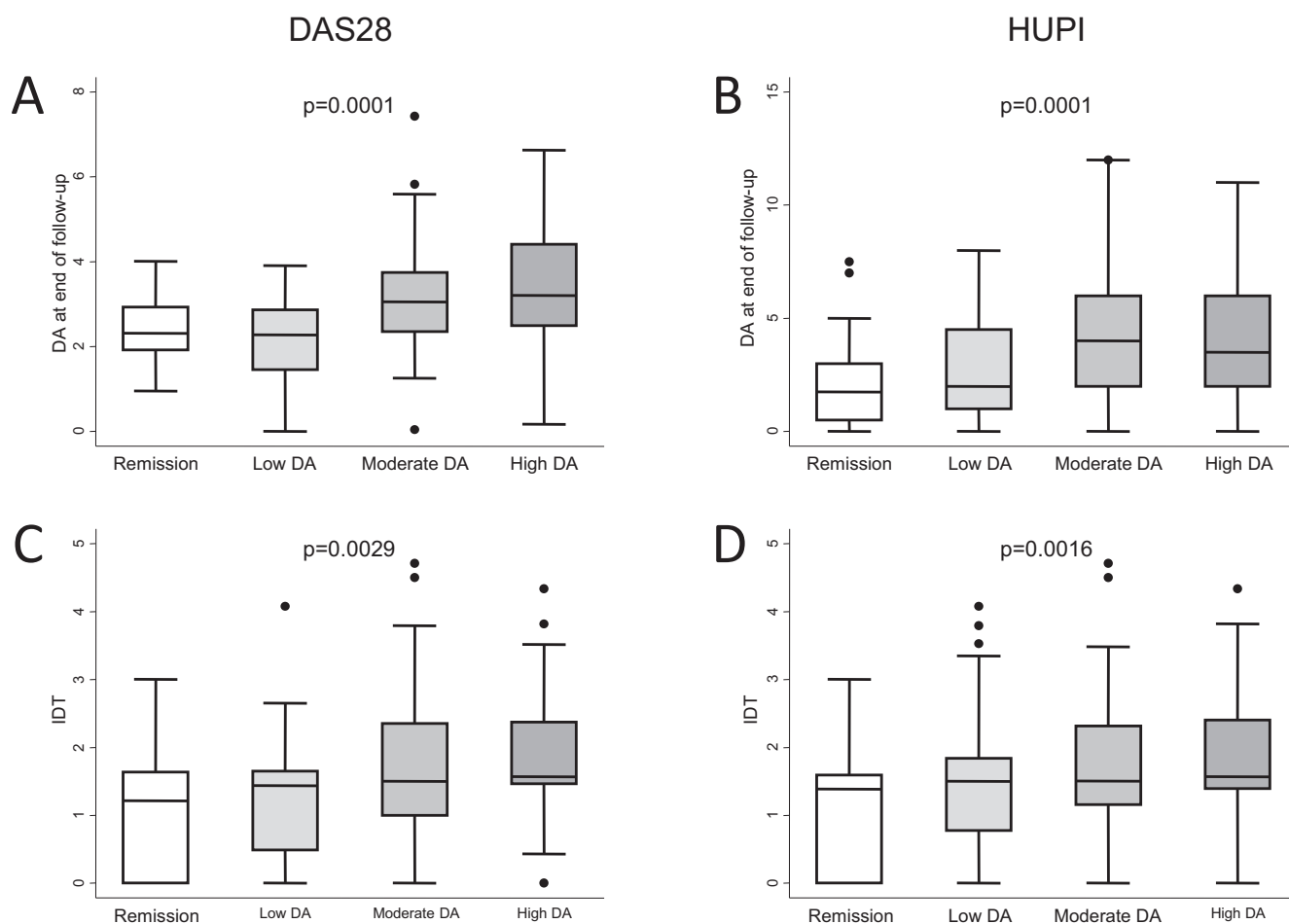


Fig. (5). Differences in clinical course of the population of the Early Arthritis Clinic at Hospital Universitario La Princesa compared with the baseline level of disease activity assessed with either DAS28 (A and C) or HUPI (B and D). **A)** Disease activity (DA) at the end of follow-up measured by DAS28 ($n = 23, 23, 98,$ and 83 at remission, low, moderate, or high disease activity, respectively). **B)** Disease activity at the end of follow-up measured by HUPI ($n = 28, 64, 69,$ and 91 at remission, low, moderate, or high disease activity, respectively). **C** and **D)** Intensity of treatment with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) was estimated as described in the section "Need for treatment as a surrogate outcome for disease severity in RA". Data are presented as the inter-quartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p95 (line above the box) and p5 (line below the box), of the respective variables. Dots represent outliers. Statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis test.

of the treat to target approach and the bias of indication. Multivariate longitudinal analyses adjusting for conventional poor prognostic markers and for drug prescription were needed to unravel the association between increased serum IL15 levels and increased disease activity [49]. Moreover, patients with increased levels of IL15 or ACPA positivity were more frequently treated with combined therapy or TNF blockers, although physicians were only aware of the result of ACPA and not serum IL15 levels [49].

During the last 20 years, vasoactive intestinal peptide (VIP), a neuropeptide synthesized by immune cells, has emerged as a therapeutic agent owing to its notable immunoregulatory and anti-inflammatory effects [89-92].

Treatment with exogenous VIP decreased the frequency and severity of symptoms in a murine model of collagen-induced arthritis [93]. The therapeutic effect of VIP has been attributed to its capacity to downregulate inflammatory factors, to regulate various lymphocyte subsets (Th1, Th2, Treg, and Th17), and to protect against bone erosion by altering the RANK/RANKL/OPG system [94, 95]. *Ex vivo* assays with fibroblast-like synoviocytes (FLS) and peripheral blood lymphocytes from RA patients have shown that VIP modulates different proinflammatory pathways suggesting beneficial effects of this molecule on the functional capacity of human lymphocytes [96-100].

Interestingly, FLS from RA patients show lower expression of VIP than FLS from osteoarthritis (OA) patients [101]. Recently, Jiang *et al.* reported decreased VIP expression in the synovial fluid and joint cartilage of patients with severe OA [102], as well as it occurs in patients with juvenile idiopathic arthritis compared to healthy controls [103].

Considering these findings, we have recently tested the utility of measuring serum VIP as a clinical biomarker in our population of early arthritis patients [104]. Several important conclusions arose from this study. First, baseline serum levels of VIP were lower in patients who show a worse clinical course and increased requirements for treatment in the first two years of disease monitoring [104]. Interestingly, measurement of serum VIP levels at baseline extended the predictive value of poor outcome of ACPA since ACPA-negative patients with low VIP serum levels had a higher degree of disease activity than ACPA-negative patients with normal serum VIP levels and an even higher degree of disease activity than ACPA-positive patients [104]. Moreover, VIP levels showed no variation during follow-up [104] suggesting that assessment of VIP concentrations could provide prognostic information for EA patients independently of the treatment prescribed and the phase of the disease, an improvement of potential clinical relevance.

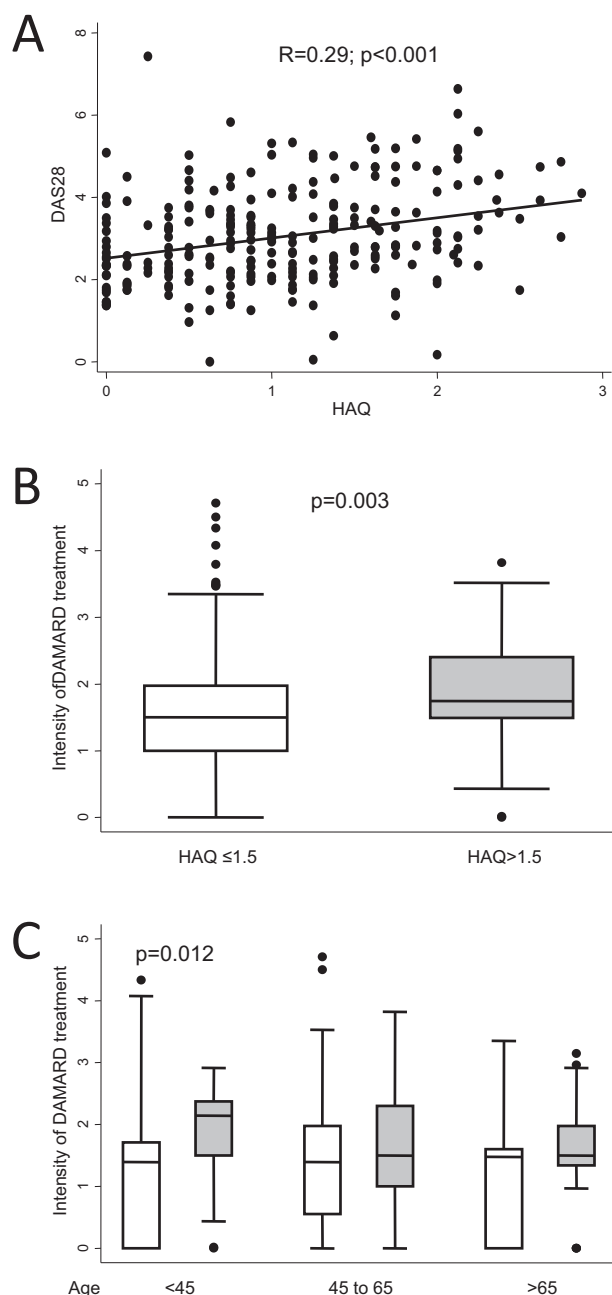


Fig. (6). Differences in the clinical course of the population of the Early Arthritis Clinic at Hospital Universitario La Princesa considering the baseline level of disability measured by the Health Assessment Questionnaire (HAQ). **A)** Correlation between disease activity at the end of follow-up measured by DAS28 and baseline HAQ score ($n = 248$). Data are shown as a dot plot, and the linear prediction was obtained with the *lfit* command of Stata 12. Statistical significance was determined using the Pearson test. **B)** Intensity of treatment with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) was estimated as described in the section “Need for treatment as a surrogate outcome for disease severity in RA” ($n = 195$ and 75 if $HAQ \leq 1.5$ or >1.5 respectively). **C)** Intensity of DMARD treatment clustered by HAQ level and age. In B and C, data are presented as the interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p95 (line above the box) and p5 (line below the box), of the respective variables. Dots represent outliers. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. In panel C, considering that multiple comparisons were performed, statistical significance was set at <0.017 .

Finally, in addition to the problem of confounding by indication caused by conventional prognostic factors, serum cytokine levels raise additional concerns, such as their low accuracy as biomarkers. The heterogeneous nature of cytokine expression profiles in the general population further complicates statistical analysis, and technical reliability is limited by wide inter-assay variability. Furthermore, depending on the target, treatment with synthetic or biologic DMARDs can modify cytokine levels. Therefore, in order to obtain more accurate and robust markers, researchers are directing their efforts towards genetic biomarkers capable of overcoming the noise caused by fluctuations in cytokine expression.

Genetic Biomarkers

Many genetic studies have assessed the risk of developing RA, and many studies analyze the predictive value of genetic variants in the prognosis of RA, focusing mainly on radiological progression. In addition, genetic studies have tried to predict the response to the most commonly used drugs, methotrexate and TNF blockers. These topics are widely described elsewhere in this review issue. However, to our knowledge, no studies have focused on the usefulness of genetic markers to predict the need for more intensive treatment as a surrogate marker of disease severity.

We recently showed that patients who are homozygous for the T allele of the single-nucleotide polymorphism rs7574865 in *STAT4* experience more severe disease [105]. In this work, we also studied the effect of carrying the shared epitope (SE) in *HLA-DRB1* or the minor allele of rs2476601 in *PTPN22* on the disease activity scores of patients with early RA. The statistical model was adjusted for several confounders such as age, gender, and the presence of ACPA. Under these conditions, carrying the SE was not associated with worse disease progress, probably because only smokers with the SE develop ACPA [105]. In addition, we observed a trend toward less active disease in patients carrying the T allele of rs2476601 in *PTPN22* [105], although the prevalence of this genetic variant is clearly lower in Spain than in northern Europe [106].

Considering the IDT variable, the presence of the SE was associated with an increased need for treatment Fig. (7, upper left panel). However, neither the genetic variant of *STAT4* nor that of *PTPN22* was associated with higher IDT values Fig. (7, left middle and lower panels, respectively). By contrast, the presence of both SE and the T allele of rs7574865 in *STAT4* was associated with wider prescription of combined therapy and with a lower frequency of non-DMARD treatment. The controversial findings with *STAT4* can be explained by the fact that the rheumatologists were blind to the result of testing for these genetic variants and patients with a slowly worsening course could be neglected owing to a delay in prescription of combined therapy. Consequently, IDT could be lower than expected in those patients. By contrast, most patients carrying the SE also displayed ACPA positivity; therefore, physicians were more likely to prescribe intense treatment earlier, leading to higher IDT values [105]. As a consequence, we did not observe a worse clinical course in patients carrying SE, as we did in those who were homozygous for the T allele of rs7574865 in *STAT4* [105].

CONCLUSION

In this article, we discuss the need for treatment, under conditions of routine clinical practice, as a pertinent surrogate marker of disease severity in early arthritis cohorts. Our experience shows that intensity of DMARD treatment can be useful to explore prognostic biomarkers in patients with early arthritis. We also emphasize that currently recognized markers of poor prognosis could act as an environmental factor that modifies the behavior of rheumatologists and somehow invalidates the efficacy of classic outcomes (radiological progression, level of disease activity) in detecting new biomarkers. Therefore, simple statistical analysis (bivariate) is no longer valid, since many factors now act as confounders. Adjust-

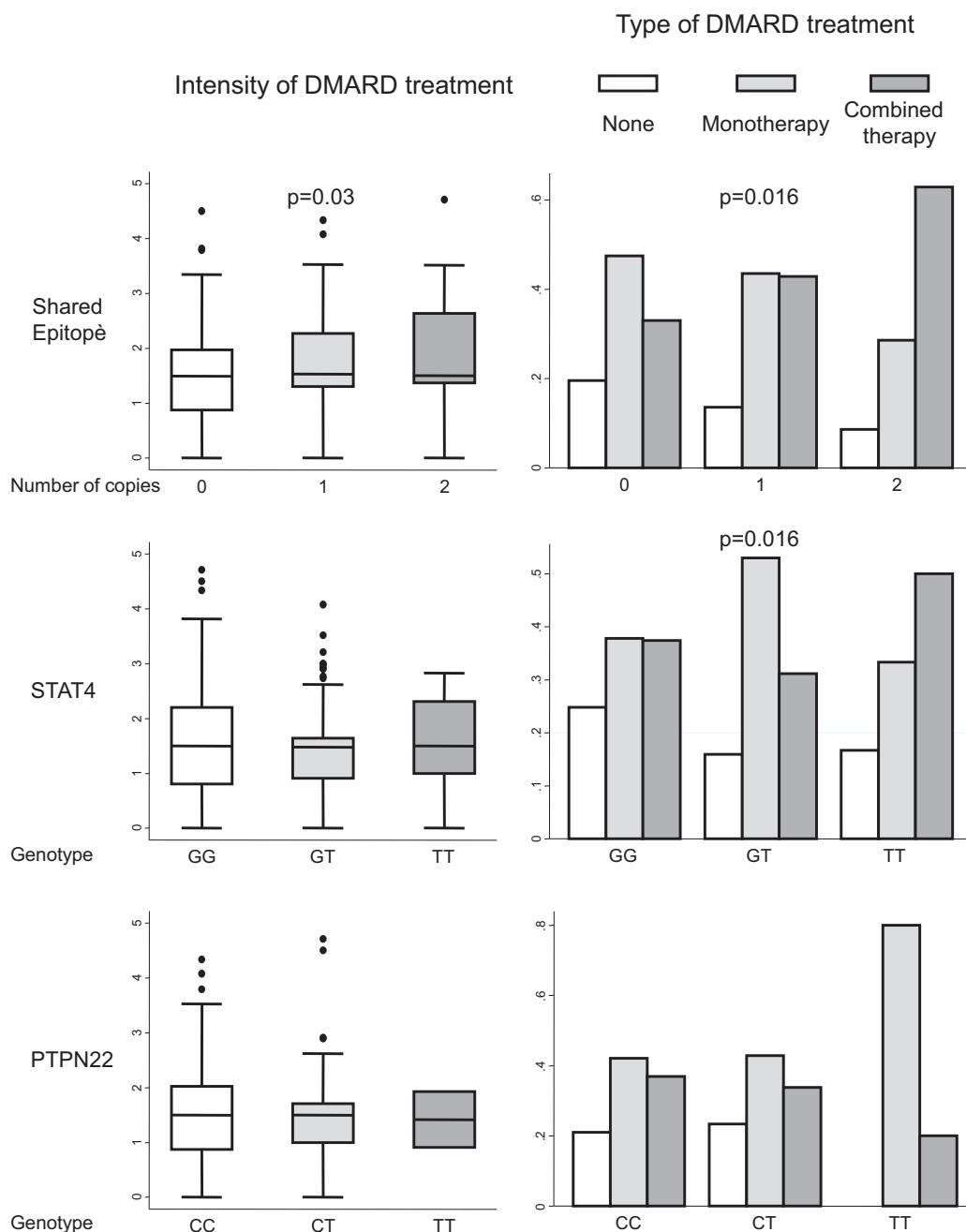


Fig. (7). Need for treatment in patients with early arthritis clustered by the number of copies of alleles encoding for the shared epitope in *HLA-DRB1*, the T allele in rs7574865 of *STAT4*, or the T allele of rs2476601 in *PTPN22*. In the left panels, data are presented as the interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), as well as the p95 (line above the box) and p5 (line below the box), of the intensity of treatment with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) (see the section “Need for treatment as a surrogate outcome for disease severity in RA” for definition). Dots represent outliers. Statistical significance was established using the Kruskal-Wallis test. In the right panels, data are shown as the percentage of patients with each type of DMARD treatment (none, monotherapy, or combined therapy) in each subpopulation. Statistical significance was established using the Fisher exact test.

ment for these confounders or modifiers of disease progress is needed. Gender, age at onset, and presence of ACPA should be systematically considered when assessing the value of biomarkers in predicting outcomes in EAC populations.

Studies of this type are affected by 2 drawbacks. First, in addition to confounders, interactions between biomarkers might mask the effect of a new one. To overcome this shortcoming, we are committed to more complex analysis to explore these interactions; therefore, larger sample populations are required. It is essential to increase sample sizes by means of collaborative efforts between

different groups. Second, many of these biomarkers could be hidden, since they have no effect on disease incidence, although they can modulate its intensity.

In summary, changing paradigms such as the early treat to target strategy are improving the outcome of patients with newly diagnosed RA and making the search for new biomarkers of prognosis more exciting and challenging. Surrogate markers of disease severity such as need for biologic agents or estimation of the intensity of treatment could provide useful results.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI08/0025, PI11/00195, PI11/00505, PI11/551, PI12/0758, RETICS RD08/0075, RD12/0009).

ABBREVIATIONS

ACPA	=	Anticitrullinated Protein Antibody
ACR	=	American College of Rheumatology
B cells	=	B lymphocytes
DAS28	=	Disease Activity Score measured in 28 joints
DMARD/DMARDs	=	Disease-Modifying Antirheumatic Drugs
EA	=	Early Arthritis
EAC/EACs	=	Early Arthritis Clinics
EULAR	=	The European League Against Rheumatism
Fig	=	Figure
FLS	=	Fibroblast-Like Synoviocytes
HAQ	=	Health Assessment Questionnaire
HLADRB1	=	HLA class II Histocompatibility Antigen, DRB1-9 beta chain
HUP	=	Hospital Universitario de La Princesa
HUPI	=	Hospital Universitario La Princesa Index
IDT	=	Intensity of DMARD Treatment
IL-15	=	Interleukin 15
IL17	=	Interleukin 17
NK cells	=	Natural Killer cells
OA	=	Osteoarthritis
OPG	=	Osteoprotegerin
p25	=	percentile 25
p5	=	percentile 5
p50	=	percentile 50
p75	=	percentile 75
p95	=	percentile 95
PTPN22	=	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22
RA	=	Rheumatoid Arthritis
RANK	=	Receptor Activator of Nuclear Factor κ -B
RANKL	=	Receptor Activator of Nuclear Factor κ -B Ligand
RF	=	Rheumatoid Factor
SE	=	Shared Epitope
SER	=	Spanish Society of Rheumatology
STAT4	=	Signal Transducer and Activator of Transcription 4
Th1	=	T helper 1 lymphocytes
Th17	=	T helper 17 lymphocytes
Th2	=	T helper 2 lymphocytes
TNF	=	Tumor Necrosis Factor
Treg	=	Regulatory T lymphocytes
US	=	United States
VIP	=	Vasoactive Intestinal Peptide

The following abbreviations correspond to specific names of patient cohorts of early arthritis or to studies and projects carried out in these cohorts

emAR
SERAP
FIN-RACO
TICORA
CAMERA
BeSt

REFERENCES

- [1] Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010; 24: 733-45.
- [2] Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376: 1094-108.
- [3] Welsing PM, van Gestel AM, Swinkels HL, Kiemeny LA, van Riel PL. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2009-17.
- [4] Bansback N, Marra CA, Finckh A, Anis A. The economics of treatment in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009; 23: 83-92.
- [5] Lajas C, Abasolo L, Bellajdel B, et al. Costs and predictors of costs in rheumatoid arthritis: a prevalence-based study. *Arthritis Rheum* 2003; 49: 64-70.
- [6] Yelin E, Wanke LA. An assessment of the annual and long-term direct costs of rheumatoid arthritis: the impact of poor function and functional decline. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1209-18.
- [7] Lundkvist J, Kastang F, Kobelt G. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs. *Eur J Health Econ* 2008; 8 Suppl 2: S49-60.
- [8] Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 130-6.
- [9] Navarro-Cano G, Del Rincon I, Pogossian S, Roldan JF, Escalante A. Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2425-33.
- [10] Pincus T, Callahan LF, Sale WG, Brooks AL, Payne LE, Vaughn WK. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 864-72.
- [11] Sokka T, Abelson B, Pincus T. Mortality in rheumatoid arthritis: 2008 update. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(5 Suppl 51): S35-61.
- [12] Bergstrom U, Book C, Lindroth Y, Marsal L, Saxne T, Jacobsson L. Lower disease activity and disability in Swedish patients with rheumatoid arthritis in 1995 compared with 1978. *Scand J Rheumatol* 1999; 28: 160-5.
- [13] Pincus T, Brooks RH, Callahan LF. Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures. *Ann Intern Med* 1994; 120: 26-34.
- [14] Healey LA, Wilske KR. Reforming the pyramid. A plan for treating rheumatoid arthritis in the 1990s. *Rheum Dis Clin North Am* 1989; 15: 615-9.
- [15] Wilske KR, Healey LA. Remodeling the pyramid--a concept whose time has come. *J Rheumatol* 1989; 16: 565-7.
- [16] Hess EV, Luggen ME. Remodeling the pyramid--a concept whose time has not yet come. *J Rheumatol* 1989; 16: 1175-6.
- [17] McCarty DJ. Suppress rheumatoid inflammation early and leave the pyramid to the Egyptians. *J Rheumatol* 1990; 17: 1115-8.
- [18] O'Dell JR. Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity? *Arthritis Rheum* 2002; 46: 283-5.
- [19] Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC, Felson DT. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 22-9.
- [20] Nell VP, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 906-14.

- [21] Gremese E, Salaffi F, Bosello SL, *et al.* Very early rheumatoid arthritis as a predictor of remission: a multicentre real life prospective study. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 858-62.
- [22] Aletaha D, Breedveld FC, Smolen JS. The need for new classification criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3333-6.
- [23] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1580-8.
- [24] Verstappen SM, McCoy MJ, Roberts C, Dale NE, Hassell AB, Symmons DP. Beneficial effects of a 3-week course of intramuscular glucocorticoid injections in patients with very early inflammatory polyarthritis: results of the STIVEA trial. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 503-9.
- [25] Emery P, Durez P, Dougados M, *et al.* Impact of T-cell costimulation modulation in patients with undifferentiated inflammatory arthritis or very early rheumatoid arthritis: a clinical and imaging study of abatacept (the ADJUST trial). *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 510-6.
- [26] Saleem B, Mackie S, Quinn M, *et al.* Does the use of tumour necrosis factor antagonist therapy in poor prognosis, undifferentiated arthritis prevent progression to rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1178-80.
- [27] Quinn MA, Green MJ, Marzo-Ortega H, *et al.* Prognostic factors in a large cohort of patients with early undifferentiated inflammatory arthritis after application of a structured management protocol. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3039-45.
- [28] Raza K, Filer A. Predicting the development of RA in patients with early undifferentiated arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009; 23: 25-36.
- [29] van der Helm-van Mil AH, le Cessie S, van Dongen H, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. A prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: how to guide individual treatment decisions. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 433-40.
- [30] Verpoort KN, van Dongen H, Allaart CF, Toes RE, Breedveld FC, Huizinga TW. Undifferentiated arthritis--disease course assessed in several inception cohorts. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(5 Suppl 35): S12-7.
- [31] Hernandez-Garcia C, Vargas E, Abasolo L, *et al.* Lag time between onset of symptoms and access to rheumatology care and DMARD therapy in a cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 2323-8.
- [32] Gonzalez-Alvaro I, Hernandez-Garcia C. El estudio emAR. Variabilidad en el uso de recursos terapéuticos. emAR Estudio sobre el manejo de la Artritis Reumatoide. Barcelona: TINGS Servicios de Comunicación 2001; 92-128.
- [33] Villaverde V, Descalzo MA, Carmona L, Bascones M, Carbonell J. Characteristics of early arthritis units that may be associated with better referral efficiency: survey of SERAP units. *Reumatol Clin* 2011; 7: 236-40.
- [34] Descalzo MA, Carbonell J, Gonzalez-Alvaro I, *et al.* Effectiveness of a clinical practice intervention in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2012; 64: 321-30.
- [35] Grigor C, Capell H, Stirling A, *et al.* Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): a single-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 263-9.
- [36] Allaart CF, Breedveld FC, Dijkmans BA. Treatment of recent-onset rheumatoid arthritis: lessons from the BeSt study. *J Rheumatol Suppl* 2007; 80: 25-33.
- [37] Mottonen T, Hannonen P, Leirisalo-Repo M, *et al.* Comparison of combination therapy with single-drug therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised trial. FIN-RACo trial group. *Lancet* 1999; 353: 1568-73.
- [38] Verstappen SM, Jacobs JW, van der Veen MJ, *et al.* Intensive treatment with methotrexate in early rheumatoid arthritis: aiming for remission. Computer Assisted Management in Early Rheumatoid Arthritis (CAMERA, an open-label strategy trial). *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1443-9.
- [39] Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, *et al.* Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3381-90.
- [40] Gonzalez-Alvaro I, Hernandez-Garcia C, Villaverde Garcia V, Vargas E, Ortiz AM. Variations in the drug treatment of rheumatoid arthritis in Spain. *Med Clin (Barc)* 2002; 118: 771-6.
- [41] Zink A, Listing J, Ziemer S, Zeidler H. Practice variation in the treatment of rheumatoid arthritis among German rheumatologists. *J Rheumatol* 2001; 28: 2201-8.
- [42] Sokka T, Envalds M, Pincus T. Treatment of rheumatoid arthritis: a global perspective on the use of antirheumatic drugs. *Mod Rheumatol* 2008; 18: 228-39.
- [43] Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JW, *et al.* Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 631-7.
- [44] Huizinga TW, van der Helm-van Mil A. A quantitative approach to early rheumatoid arthritis. *Bull Hosp Jt Dis* 2011; 69: 116-21.
- [45] Boers M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1771-4.
- [46] Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1998; 101: 273-81.
- [47] Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, *et al.* The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63.
- [48] Verstappen SM, Lunt M, Bunn DK, Scott DG, Symmons DP. In patients with early inflammatory polyarthritis, ACPA positivity, younger age and inefficacy of the first non-biological DMARD are predictors for receiving biological therapy: results from the Norfolk Arthritis Register. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 1428-32.
- [49] Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Alvaro-Gracia JM, *et al.* Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis. *PLoS One* 2011; 6: e29492.
- [50] Felson DT, Anderson JJ, Meenan RF. Use of short-term efficacy/toxicity tradeoffs to select second-line drugs in rheumatoid arthritis. A metaanalysis of published clinical trials. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 1117-25.
- [51] Laan RF, van Riel PL, van de Putte LB. Leflunomide and methotrexate. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 159-63.
- [52] Alarcon GS. Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 21: 589-604.
- [53] Leeb BF, Haindl PM, Maktari A, Nothnagl T, Rintelen B. Disease activity score-28 values differ considerably depending on patient's pain perception and sex. *J Rheumatol* 2007; 34: 2382-7.
- [54] Ahlmen M, Svensson B, Albertsson K, Forslund K, Hafstrom I. Influence of gender on assessments of disease activity and function in early rheumatoid arthritis in relation to radiographic joint damage. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 230-3.
- [55] Castrejon I, Carmona L, Ortiz AM, Belmonte MA, Martinez-Lopez JA, Gonzalez-Alvaro I. Development and validation of a new disease activity index as a numerical sum of four variables in patients with early arthritis. *Arthritis Care Res* 2013; 65: 518-25.
- [56] Pease CT, Bhakta BB, Devlin J, Emery P. Does the age of onset of rheumatoid arthritis influence phenotype?: a prospective study of outcome and prognostic factors. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38: 228-34.
- [57] Huscher D, Sengler C, Gromnica-Ihle E, *et al.* Clinical presentation, burden of disease and treatment in young-onset and late-onset rheumatoid arthritis: a matched-pairs analysis taking age and disease duration into account. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31: 256-62.
- [58] DeWitt EM, Lin L, Glick HA, Anstrom KJ, Schulman KA, Reed SD. Pattern and predictors of the initiation of biologic agents for the treatment of rheumatoid arthritis in the United States: an analysis using a large observational data bank. *Clin Ther* 2009; 31: 1871-80.
- [59] Dixon WG, Abrahamowicz M, Beauchamp ME, *et al.* Immediate and delayed impact of oral glucocorticoid therapy on risk of serious infection in older patients with rheumatoid arthritis: a nested case-control analysis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 1128-33.
- [60] Listing J, Gerhold K, Zink A. The risk of infections associated with rheumatoid arthritis, with its comorbidity and treatment. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52: 53-61.
- [61] Winthrop KL. Infections and biologic therapy in rheumatoid arthritis: our changing understanding of risk and prevention. *Rheum Dis Clin North Am* 2012; 38: 727-45.

- [62] Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 357-65.
- [63] Emery P, Dörner T. Optimising treatment in rheumatoid arthritis: a review of potential biological markers of response. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 2063-70.
- [64] González-Álvarez I, Descalzo MA, Carmona L. Trends towards an improved disease state in rheumatoid arthritis over time: influence of new therapies and changes in management approach: analysis of the EMECAR cohort. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R138.
- [65] Michaud K, Wallenstein G, Wolfe F. Treatment and nontreatment predictors of health assessment questionnaire disability progression in rheumatoid arthritis: a longitudinal study of 18,485 patients. *Arthritis Care Res* 2011; 63: 366-72.
- [66] Louie GH, Reveille JD, Ward MM. Challenges comparing functional limitations in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27(4 Suppl 55):S83-91.
- [67] Robinson WH, Lindstrom TM, Cheung RK, Sokolove J. Mechanistic biomarkers for clinical decision making in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9: 267-76.
- [68] González-Álvarez I, Ortiz AM, Tomero EG, *et al.* Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1675-8.
- [69] Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, *et al.* High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1744-53.
- [70] Crotti TN, Smith MD, Weedon H, *et al.* Receptor activator NF-kappaB ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, osteoarthritis, and from normal patients: semiquantitative and quantitative analysis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 1047-54.
- [71] Geusens PP, Landewe RB, Garnero P, *et al.* The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1772-7.
- [72] Cho ML, Ju JH, Kim KW, *et al.* Cyclosporine A inhibits IL-15-induced IL-17 production in CD4+ T cells via down-regulation of PI3K/Akt and NF-kappaB. *Immunol Lett* 2007; 108:88-96.
- [73] González-Álvarez I, Ortiz García AM, Domínguez-Jiménez C, *et al.* Inhibition of TNF and IL-17 production by leflunomide involves the JAK/STAT pathway. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1644-50.
- [74] Yoshihara K, Yamada H, Hori A, Yajima T, Kubo C, Yoshikai Y. IL-15 exacerbates collagen-induced arthritis with an enhanced CD4+ T cell response to produce IL-17. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2744-52.
- [75] Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, *et al.* High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers *in vitro* IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 2000; 164: 2832-8.
- [76] González-Álvarez I, Domínguez-Jiménez C, Ortiz AM, *et al.* Interleukin-15 and interferon-gamma participate in the cross-talk between natural killer and monocytic cells required for tumour necrosis factor production. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R88.
- [77] McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis [see comments]. *Nat Med* 1997; 3: 189-95.
- [78] Miranda-Carus ME, Balsa A, Benito-Miguel M, Perez de Ayala C, Martín-Mola E. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate. *J Immunol* 2004; 173: 1463-76.
- [79] Benito-Miguel M, García-Carmona Y, Balsa A, *et al.* IL-15 Expression on RA Synovial Fibroblasts Promotes B Cell Survival. *PLoS One* 2012; 7:e40620.
- [80] Carroll HP, Paunovic V, Gadina M. Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 1269-77.
- [81] Liu CC, Perussia B, Young JD. The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol Today* 2000; 21: 113-6.
- [82] Miranda-Carus ME, Benito-Miguel M, Balsa A, *et al.* Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1151-64.
- [83] Ogata Y, Kukita A, Kukita T, *et al.* A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. *J Immunol* 1999; 162: 2754-60.
- [84] Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS. Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2005; 1: 47-54.
- [85] Knevel R, Krabben A, Brouwer E, *et al.* Genetic variants in IL15 associate with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis: a multicohort study. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 1651-7.
- [86] Ruchatz H, Leung BP, Wei XQ, McInnes IB, Liew FY. Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J Immunol* 1998; 160: 5654-60.
- [87] Baslund B, Tvede N, Danneskiold-Samsøe B, *et al.* Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: A proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2686-92.
- [88] Lamana A, Ortiz AM, Álvarez-Gracia JM, *et al.* Characterization of serum interleukin-15 in healthy volunteers and patients with early arthritis to assess its potential use as a biomarker. *Eur Cytokine Netw* 2010; 21: 186-94.
- [89] Abad C, Gomariz RP, Waschek JA. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 151-63.
- [90] Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martínez C. VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1070: 51-74.
- [91] González-Rey E, Ganea D, Delgado M. Neuropeptides: keeping the balance between pathogen immunity and immune tolerance. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10: 473-81.
- [92] Gomariz RP, Gutiérrez-Canas I, Arranz A, *et al.* Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1063-80.
- [93] Delgado M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 2001; 7: 563-8.
- [94] Juarranz Y, Abad C, Martínez C, *et al.* Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R1034-45.
- [95] Leceta J, Gomariz RP, Martínez C, Carrion M, Arranz A, Juarranz Y. Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 134-8.
- [96] Gutiérrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B, *et al.* VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 527-32.
- [97] Gutiérrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B, *et al.* Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 2008; 22: 312-7.
- [98] Carrion M, Juarranz Y, Pérez-García S, *et al.* RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1626-36.
- [99] Pérez-García S, Juarranz Y, Carrion M, *et al.* Mapping the CRF-urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts: effect of vasoactive intestinal peptide. *J Cell Physiol* 2011; 226: 3261-9.
- [100] Carrion M, Juarranz Y, Martínez C, *et al.* IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52: 2177-86.
- [101] Juarranz Y, Gutiérrez-Canas I, Santiago B, Carrion M, Pablos JL, Gomariz RP. Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1086-95.
- [102] Jiang W, Gao SG, Chen XG, *et al.* Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: a new indicator of disease severity? *Clin Biochem* 2012; 45: 1607-12.
- [103] El-Sayed ZA, Mostafa GA, Aly GS, El-Shahed GS, El-Aziz MM, El-Emam SM. Cardiovascular autonomic function assessed by autonomic function tests and serum autonomic neuropeptides in

- Egyptian children and adolescents with rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48: 843-8.
- [104] Martinez C, Ortiz AM, Juarranz Y, *et al.* Serum levels of vasoactive intestinal Peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS One* 2014; 9: e85248.
- [105] Lamana A, Balsa A, Rueda B, *et al.* The TT Genotype of the STAT4 rs7574865 Polymorphism Is Associated with High Disease Activity and Disability in Patients with Early Arthritis. *PLoS One* 2012; 7: e43661.
- [106] Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett* 2011; 585: 3689-98.

Received: March 20, 2014

Accepted: August 13, 2014

Discusión

IV. DISCUSIÓN

En las últimas décadas se han descrito diversos biomarcadores en el campo de las enfermedades reumáticas enfocados a la diagnosis de la patología o al ajuste del tratamiento en virtud de los cambios en la actividad de la enfermedad y otros *outcomes*. Sin embargo, hasta la fecha, no existen marcadores que puedan salvar la brecha entre el inicio de la enfermedad y la prescripción del primer FAME, ni tampoco que permitan identificar a aquellos pacientes que se beneficiarían de un tratamiento precoz más agresivo. Además, en la AR de reciente comienzo, los *outcomes* sufren un sesgo considerable como consecuencia del tratamiento prescrito. Por tanto, continúan sin resolverse algunos retos en el campo de los biomarcadores pronóstico en este tipo de patologías. En este contexto, la relevancia del eje VIP/Receptores en diversos aspectos de la patogénesis de la AR y su desregulación en otras enfermedades de base autoinmune nos condujeron al estudio de su potencial capacidad como biomarcador pronóstico.

i. NIVELES SÉRICOS DE VIP Y SU ASOCIACIÓN CON LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD: PAPEL DE VIP COMO MARCADOR DE SEVERIDAD/PRONÓSTICO

Los resultados expuestos en los **Artículos 1 y 2** revelan, por primera vez, que los pacientes con AR temprana y EspA temprana que no son capaces de regular al alza sus niveles de VIP en suero experimentan un peor curso evolutivo de la enfermedad en ambas patologías. Hasta la fecha no existen estudios publicados en los que se relacione una desregulación de los niveles de VIP con un incremento del riesgo de padecer AR o EspA; sin embargo, las evidencias que señalan a este péptido como un elemento clave en la regulación del proceso inflamatorio que contribuye a la patogénesis de las enfermedades reumáticas son múltiples (González-Rey et al. 2007a).

Hemos descrito (**Artículo 1**) que, a pesar de no existir diferencias significativas en los niveles de VIP sérico entre los pacientes con AR temprana, AI y el grupo control, los niveles más bajos de VIP se concentran particularmente en el grupo de **AR temprana**. Además, comprobamos la existencia de una correlación inversa entre la concentración sérica de VIP y la actividad de la enfermedad. Así, aquellos **pacientes con niveles más bajos del péptido son los que muestran mayores puntuaciones del DAS28** y, a la inversa, pacientes en

remisión o con baja actividad de la enfermedad son los que presentan los niveles de VIP más elevados.

Esta relación entre el péptido y la severidad de la enfermedad en términos de actividad se apoya en numerosos estudios que destacan los efectos antiartríticos de VIP. Así, por ejemplo, VIP regula los perfiles de citocinas como la IL-10 o el TNF producidos por células T y macrófagos, interviniendo de forma directa en la modulación del proceso inflamatorio (Foey et al. 2003). Por otro lado, su potencial terapéutico se plasma en la disminución de la incidencia y severidad de la artritis en modelos animales, principalmente a través de la modificación del balance de células Th hacia una respuesta tipo Th2 y de la inducción de células Treg eficientes (Delgado et al. 2001, González-Rey et al. 2006b). Por otra parte, la acupuntura emergió hace algunos años como terapia alternativa para la AR y en un modelo de artritis experimental se ha comprobado que la electroacupuntura ejerce efectos antiartríticos beneficiosos que, al menos en buena parte, se deben a que produce una inducción de la expresión de VIP en el tejido sinovial (He et al. 2011) que contribuye al restablecimiento del balance Th17/Treg (Zhu et al. 2015). Además, en sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con AR y con OA el tratamiento con VIP induce menor expresión y producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias así como de elementos implicados en el proceso de destrucción articular, tales como CXCL8, MMP3 o las ADAMTS (Juaranz et al. 2004, Carrión et al. 2011, Pérez-García et al. 2016).

En su conjunto, todas estas funciones inmunoregulatoras ejercidas por VIP en el contexto de la patogénesis de la AR nos conducen a la razonable conclusión de que aquellos pacientes que no son capaces de regular sus niveles de VIP padecen respuestas autoinmunes e inflamatorias más severas y, por tanto, peores *outcomes* de la enfermedad. Además, refrendando el papel de VIP como indicador de severidad, el grupo de Jiang y cols. ha demostrado que los niveles de VIP en líquido sinovial y cartílago articular de pacientes con OA se asocian negativamente con la progresión del daño articular, actuando como un potencial indicador de severidad de la enfermedad (Jiang et al. 2012). En esta misma línea argumental, un estudio reciente ha demostrado que bajos niveles plasmáticos de VIP se asocian con una peor función cardíaca en pacientes con la enfermedad de Chagas y que, por tanto, la expresión de VIP puede ser útil en la evaluación de la susceptibilidad a la progresión hacia formas más graves de la enfermedad (Correa, da Costa Rocha et al. 2013). También se han descrito niveles bajos de VIP en pacientes con artritis juvenil idiopática afectados por neuropatía cardíaca autonómica asociada a la disfunción del sistema parasimpático, sugiriéndose la utilidad de la determinación de VIP para valorar el riesgo de desarrollo de esta comorbilidad (El-Sayed et al. 2009).

Hasta el momento, los parámetros propuestos como predictores del curso a largo plazo de la AR temprana, tales como los reactantes de fase aguda y los anticuerpos FR y ACPA, han resultado insuficientes, permitiendo clasificar solamente a un 65% de los pacientes que sufrirán un peor curso evolutivo (de Vries-Bouwstra et al. 2008, Smolen et al. 2008, Raza y Filer 2009, Szodoray et al. 2010, González-Álvaro et al. 2011). En este contexto, además de poner de manifiesto la correlación negativa entre los niveles de VIP y la actividad de la enfermedad en la AR de inicio, en el **Artículo 1** nos propusimos analizar en qué medida los niveles basales de VIP (visita 1) podrían ser predictores de la severidad de la enfermedad en fases más avanzadas del seguimiento (visita 4, tras dos años). Comprobamos que aquellos **pacientes que tras dos años de seguimiento mantienen una elevada actividad de la enfermedad son los que presentaban niveles basales bajos de VIP**. Además, nuestros resultados muestran una marcada interferencia entre los niveles de VIP y la positividad para los ACPA, uno de los principales marcadores reconocidos de severidad y mal pronóstico en la AR (van der Helm-van Mil et al. 2005). Así, los **pacientes ACPA⁻ con bajos niveles de VIP sérico sufren una mayor actividad de la enfermedad** que aquellos ACPA⁻ con niveles normales del péptido e incluso mayor que la de pacientes ACPA⁺. Esto sugiere que la determinación basal de VIP podría emplearse como complemento al valor predictivo proporcionado por el estatus de estos autoanticuerpos. Dentro del grupo de pacientes seropositivos no se observan diferencias significativas en cuanto al grado de actividad de la enfermedad entre pacientes con distintos niveles de VIP, posiblemente como consecuencia de que la positividad para los ACPA históricamente implica mayor intensidad de las terapias con FAMEs (Seegobin et al. 2014). Precisamente, en lo que a la intensidad de tratamiento se refiere, como otro posible marcador de severidad (González-Álvaro et al. 2011), encontramos que los **pacientes ACPA⁺ con bajos niveles de VIP tienen un mayor requerimiento de FAMEs que los ACPA⁺ con niveles normales del péptido**. En el caso del grupo de pacientes seronegativos, la presencia de niveles bajos de VIP supone gran heterogeneidad en la prescripción del tratamiento, pero ha de tenerse en cuenta que el médico carece de información en lo referente a los niveles del péptido y que, en cualquier caso, se observan mayores requerimientos de tratamiento en este grupo que en el de pacientes ACPA⁻ con niveles normales de VIP.

La identificación de biomarcadores pronóstico en AR temprana es compleja como consecuencia de la falta de herramientas diseñadas para la evaluación de la severidad de los pacientes. Los índices de severidad propuestos hasta la fecha muestran en general una correlación baja con parámetros indicativos de la misma, tales como el DAS28, la intensidad de tratamiento o el HAQ (van der Helm-van Mil 2014, Toledano et al. 2017). Sin embargo,

tal como hemos visto hasta ahora, los niveles séricos de VIP sí muestran asociación tanto con la actividad de la enfermedad como con la intensidad de la terapia con FAMES.

Por otro lado, el hecho de que no se observen variaciones relevantes en los niveles de VIP a lo largo del seguimiento, tanto en el caso de la AR (**Artículo 1**) como en la EspA (**Artículo 2**) otorga a VIP una característica deseable en un biomarcador de pronóstico, tal como es el hecho de que sus niveles basales dependan de diferencias entre individuos y no se vean afectados por factores externos. De este modo, la concentración de VIP permitiría evaluar el pronóstico con independencia de la fase de la enfermedad y de los fármacos prescritos hasta el momento.

Centrándonos en la EspA (**Artículo 2**), observamos nuevamente que no existen diferencias significativas en los niveles séricos de VIP entre el grupo de pacientes con EspA diagnosticada según el cumplimiento de los criterios ASAS/New York y el grupo de pacientes con dolor de espalda crónico no-específico. Dado que la EspA es una enfermedad cuya patogénesis oscila entre la autoinmunidad y la autoinflamación (Ambarus et al. 2012) es lógica la asunción de que un péptido con las propiedades antiinflamatorias e inmunoregulatoras de VIP pueda asociarse con algunas de las características clínicas más destacadas de esta enfermedad.

Si bien un estudio previo describía la presencia de niveles elevados de VIP en pacientes con espondilitis anquilosante respecto a controles sanos (Nalbant et al. 2011), nuestros datos no muestran diferencias entre los grupos de estudio. Esta discrepancia es atribuible a claras diferencias entre las poblaciones de estudio en términos de sexo, edad, etnia, selección de los controles y al hecho de que nuestro estudio se centra en los estadíos iniciales y no en etapas avanzadas de la enfermedad. Además, hemos de tener en cuenta que no hay evidencias que refrenden el papel de VIP como marcador diagnóstico ni su potencial en la discriminación de casos y controles, mientras que nuestra hipótesis del papel del péptido como predictor de severidad se apoya en nuestro estudio previo en AR temprana (**Artículo 1**) y en los resultados obtenidos en OA (Jiang et al. 2012) comentados previamente.

Nuestros resultados revelan por primera vez la asociación entre **bajos niveles séricos del péptido y un incremento en la severidad de la enfermedad en pacientes con EspA de reciente comienzo**, en términos de mayor deterioro funcional, presencia de sacroileitis en las IRM y mayor carga inflamatoria de la enfermedad en forma de entesitis, anemia y psoriasis.

Uno de los resultados más interesantes obtenidos en este estudio es la **correlación negativa entre los niveles de VIP y la evolución del índice BASFI** a lo largo del

seguimiento, indicando un mayor deterioro funcional en aquellos pacientes incapaces de *up*-regular VIP y apuntando a su valor predictivo del curso de la enfermedad a largo plazo. Cabría esperar que dicha correlación se manifestase también con el índice BASDAI, del mismo modo que observábamos con el DAS28 en la AR. En efecto, en el análisis bivariable observamos dicha asociación, sin embargo, ésta se pierde en el análisis multivariable. La explicación podría ser que variables de ajuste como la hemoglobina o la inflamación en las IRM son de por sí indicativas de la actividad de la enfermedad en la EspA, de modo que podemos asumir que el BASDAI no proporciona información adicional al modelo estadístico (Kiltz et al. 2012, Machado et al. 2012). Por otro lado, la correlación que existe entre ambos índices es muy elevada, sobre todo en formas precoces de la enfermedad, y ambos adolecen del inconveniente de basarse en la perspectiva subjetiva del paciente (Ward et al. 2013). Más aún, existe una explicación que respalda que los resultados obtenidos con BASFI (índice funcional) sean más concluyentes que con BASDAI o con ASDAS (índices de actividad), y ésta reside en la propia definición de los conceptos de remisión/recaída que, como hemos visto en la Introducción, supone un limitante al establecimiento del T2T dada la falta de consenso al respecto. En lo relativo a la remisión, clínicamente un ASDAS o un BASDAI inactivo puede ser un buen evaluador; sin embargo, no aporta información determinante de lo que ocurre a nivel estructural ni extra-articular (Sieper 2012). Por otro lado, el grupo de Smolen propone que la diana del tratamiento sea la remisión clínica en términos de ausencia de inflamación y síntomas (Smolen et al. 2014a), pero no existen parámetros clínicos que reflejen la histopatología de la inflamación (Maksymowych 2013). Por tanto, una diana más adecuada sería la restauración de la funcionalidad, puesto que ésta solo se puede alcanzar en estado de remisión clínica y cuando, además, se ha podido prevenir el daño estructural (Sieper 2012). De acuerdo con esta perspectiva y con el hecho de que la limitación funcional en el momento del diagnóstico se asocia con peor prognosis en la EspA (Landewe et al. 2009), la correlación entre VIP y BASFI es un hallazgo prometedor en la predicción de la evolución de los pacientes.

Una necesidad no resuelta en la EspA es la existencia de marcadores validados que permitan distinguir el dolor de espalda inflamatorio del dolor de espalda mecánico y determinar el pronóstico de los pacientes lo antes posible (de Vlam 2010, Almodovar et al. 2014). El uso cada vez más extendido de las IRM y los nuevos criterios ASAS palían en cierto modo esas deficiencias, pero aún son insuficientes para predecir la progresión de la enfermedad. En este sentido, hemos encontrado que **niveles más bajos de VIP en suero se asocian con manifestaciones extra-articulares características de la EspA** como son niveles más bajos de hemoglobina (anemia), la entesitis, la psoriasis y la presencia de inflamación en las IRM. Así, la medición de los niveles VIP en suero podría ser una herramienta útil para

detectar subpoblaciones de pacientes con una mayor carga disfuncional e inflamatoria, apoyando su papel como marcador de severidad.

Otra de las necesidades por resolver en la EspA tiene relación con la evaluación de qué pacientes se beneficiarían en mayor medida de las terapias biológicas. El bloqueo de TNF es uno de los pilares del manejo clínico de la EspA, sin embargo este tratamiento no es efectivo en un 40% de los pacientes y además está contraindicado en muchos casos como consecuencia de sus efectos adversos (van der Heijde et al. 2005, van der Heijde et al. 2006). Por tanto, su utilización debe restringirse a pacientes con una ratio riesgo/beneficio óptima y, a día de hoy, identificar a ese subgrupo de pacientes continúa siendo un reto. En este contexto, un resultado interesante de nuestro estudio es que **el tratamiento con agentes anti-TNF parece asociarse a un incremento en los niveles de VIP**. En la población de EspA (**Artículo 2**) este efecto es una tendencia que no alcanza la significación, probablemente por falta de potencia estadística dado que únicamente 3 pacientes requirieron este tratamiento a lo largo del seguimiento. Sin embargo, en la población de AR (**Artículo 1**) observamos este mismo efecto con un mayor número de pacientes, resultando significativo el incremento en los niveles de VIP como consecuencia del uso de agentes bloqueantes de TNF. De este modo podría plantearse el potencial uso de VIP como un marcador de la necesidad de prescribir fármacos anti-TNF en base a distintos hechos. Por un lado, como hemos visto, niveles bajos de VIP se asocian a mayor actividad de la enfermedad en la AR (**Artículo 1**) y mayor discapacidad funcional en la EspA (**Artículo 2**) y el bloqueo de TNF incrementa los niveles de VIP, pudiendo paliar esos efectos. Por otra parte, puntuaciones elevadas del BASFI y la presencia de entesitis, ambos parámetros asociados a niveles de VIP sérico bajos (**Artículo 2**) han sido identificados como marcadores de respuesta a esta terapia (Vastesaeger et al. 2011). Además, la anemia, asociada con la actividad inflamatoria en la EspA y también con los niveles de VIP (**Artículo 2**), mejora con el bloqueo del TNF (Furst et al. 2013).

Somos conscientes de que existen algunas limitaciones que afectan a nuestros estudios en sendos **Artículos 1 y 2**. En primer lugar, el número de pacientes incluidos en ambos registros. Si bien las muestras no son grandes, cabe destacar la ingente labor de recogida de todo tipo de datos socio-demográficos y parámetros clínicos a lo largo del seguimiento, junto con el hecho de que el diseño longitudinal del estudio nos permite evaluar un número considerable de observaciones y mejorar el control sobre las variaciones individuales. En este sentido, tanto la estructura longitudinal de nuestro estudio, como el empleo de análisis multivariantes son los más indicados para poder demostrar la capacidad predictiva de un biomarcador (Maksymowych 2015). Por otro lado, en el caso de la AR temprana, la ausencia

de una estrategia terapéutica preestablecida implica que los reumatólogos pueden interferir en los resultados a través de variaciones en la prescripción de FAMES; sin embargo, la recolección rigurosa y exhaustiva de datos sobre el tratamiento de cada paciente, el correspondiente ajuste del análisis teniendo en cuenta este factor y el hecho de que la medición de VIP sea retrospectiva y no influya en el juicio clínico, permiten paliar esa limitación. Finalmente, en ambos estudios se han empleado poblaciones mixtas que combinan, respectivamente, pacientes con AR/AI y pacientes con EspA/dolor de espalda crónico no específico. No obstante, los niveles de VIP no difieren de forma significativa entre los grupos en ninguno de los casos. Además, en el **Artículo 1** se realiza el ajuste del modelo multivariable en función del diagnóstico final y, en el caso del **Artículo 2**, se comprobó que tanto analizando la población completa como seleccionando exclusivamente a los pacientes con diagnóstico final de EspA los resultados eran prácticamente iguales.

ii. POLIMORFISMOS EN EL GEN DE VIP COMO PREDICTORES DE SUS NIVELES EN SUERO Y DE PRONÓSTICO/SEVERIDAD

Como hemos desarrollado en la Introducción, uno de los principales factores etiológicos de la AR es el genético, siendo numerosos los estudios sobre variantes genéticas que influyen en el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Viatte y Barton 2017). Sin embargo, los estudios sobre cómo la variabilidad genética puede modular la severidad de esta patología son escasos. Los avances producidos en los últimos años en técnicas como el genotipado y los estudios genéticos realizados en grandes cohortes de pacientes han permitido no solo mejorar la capacidad de diagnóstico en enfermedades como la AR, sino que también han proporcionado nuevas herramientas para evaluar el pronóstico de los pacientes. Así, es previsible que bases de datos “multi-parámétricas”, que incluyan datos genéticos, clínicos y biomarcadores puedan usarse en el futuro para mejorar el cuidado de los pacientes con AR (Goulielmos et al. 2016).

La variabilidad de la que adolece la determinación de los niveles séricos de VIP mediante la técnica del enzoinmunoensayo (**Artículos 1 y 2**) origina una dispersión notable de los valores. Para paliar este problema y optimizar los análisis estadísticos, aplicamos transformaciones matemáticas, pero esto en cierto modo podría suponer una dificultad en la implementación de la determinación de los niveles de VIP en la práctica clínica diaria. Por este motivo y dada relevancia de la genética en esta patología, nos planteamos

complementar y reorientar nuestra investigación hacia la búsqueda de marcadores genéticos que pudieran predecir los niveles séricos de VIP y estudiar su relación con la severidad de la enfermedad (**Artículo 3**).

Nuestros resultados, validados en dos subpoblaciones distintas de pacientes con AR de reciente comienzo, revelan por primera vez la existencia de **polimorfismos de un único nucleótido en el gen de VIP asociados a diferencias en los niveles séricos del péptido**. Concretamente, el rs35643203 y el rs12201140, localizados en los intrones 1 y 4 respectivamente, se asocian con niveles bajos de VIP en suero; por el contrario, el rs688136 situado en el exón 7 que codifica la región 3'UTR del mRNA, se asocia con niveles séricos elevados del péptido.

Dado que nuestros estudios previos apuntaban hacia la asociación de niveles bajos de VIP con un peor curso evolutivo de la enfermedad y con mayores requerimientos de tratamiento (**Artículo 1**) es una asunción razonable que los polimorfismos identificados en VIP y asociados a sus niveles, pudieran ser indicadores potenciales de la severidad de la enfermedad en estos pacientes.

Son varios los trabajos, que tal como hemos comentado, apoyan la hipótesis de la relación entre los niveles bajos de VIP y el control inadecuado de la respuesta inmune en diversas enfermedades. En este sentido, junto con nuestros resultados en AR (**Artículo 1**) y EspA (**Artículo 2**), se han descrito efectos similares en OA (Jiang et al. 2012, Jiang et al. 2016); en esclerosis múltiple (Andersen et al. 1984); en formas severas de cardiomiopatía de Chagas (Correa et al. 2013) y en tiroiditis autoinmune donde, además, los niveles bajos del péptido se asocian con niveles elevados de autoanticuerpos con actividad VIPasa (Bangale et al. 2003).

Por otra parte, numerosos trabajos han constatado asociaciones entre variantes genéticas y los niveles de la proteína codificada. Tal es el caso del estudio de Yi y cols. (Yi et al. 2016) que apunta a la importancia de polimorfismos en el gen del VEGF como indicadores de la actividad de la AR y las lesiones sinoviales y como factores pronóstico en la evaluación de la efectividad del tratamiento, señalando que la presencia de esas variantes genéticas se asocia con un aumento en los niveles séricos de VEGF (Yi et al. 2016). En esta misma línea, polimorfismos en el gen del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) se asocian con la gravedad de la AR y con niveles circulantes significativamente más elevados de dicho factor (Radstake et al. 2005). Otro trabajo, sobre la vía del folato en los glóbulos rojos, pone de manifiesto la relación entre la presencia de determinados polimorfismos y las variaciones en la concentración de folato a nivel celular, si bien, en este caso no encontraron

asociación entre las variantes genéticas y la actividad de la enfermedad (Stamp et al. 2010). Más aún, en un estudio realizado en una cohorte de pacientes egipcios con AR y OA se comprobó que determinados genotipos de polimorfismos en los genes que codifican las metaloproteinasas MMP1 y MMP3 pueden ser más útiles en la predicción del daño articular, la actividad y la gravedad de estas enfermedades, que la propia medición de la concentración sérica de dichas proteínas (Abd-Allah et al. 2012).

El mecanismo mediante el cual la presencia de las variantes genéticas regula la expresión génica y, por tanto, los niveles del péptido, está aún por dilucidar. En el caso de SNPs localizados en regiones intrónicas, se ha comprobado que en genes como STAT4 y CLEC16A la presencia de estas variantes modifica la expresión del mRNA y contribuye al riesgo de desarrollar AR (Skinningrud et al. 2010, Lamana et al. 2012). Un posible mecanismo consistiría en alteraciones en la eficiencia del *splicing* que originen transcritos sin un exón (Burkhardt et al. 2008, Medina et al. 2008); otra posibilidad es que la presencia de esos polimorfismos intrónicos altere la estabilidad del mensajero (Hoffmeyer et al. 2000). En el caso de nuestro SNP rs688136, su localización en 3'UTR implica posibles alteraciones de secuencias reguladoras características de esta región que permitirían eludir mecanismos reguladores y con ello el incremento en la expresión de *VIP*. Uno de esos sistemas de regulación son los miRNAs, pequeñas moléculas de RNA endógenas que se unen preferentemente a 3'UTR de los mensajeros transcritos pudiendo conducir a su degradación o a la supresión de su traducción a proteína (Kim y Nam 2006, Pillai et al. 2007). Basándonos en este razonamiento, llevamos a cabo ensayos funcionales con el miRNA miR-205-5p, para el cual existe una potencial secuencia diana en 3'UTR del *VIP* a escasos pares de bases del rs688136. Nuestros resultados apuntan a que la presencia de **la variante alélica C en ese polimorfismo no permite un reconocimiento de la diana del miR-205-5p de forma tan eficiente como la variante T**. De este modo, la evasión de ese mecanismo regulatorio repercutiría en un aumento de expresión de *VIP* y, así, en niveles más elevados de este péptido en el suero. Ciertamente, varios estudios respaldan el hecho de que la presencia de SNPs en 3'UTR puede afectar a la unión de los miRNAs y con ello a su función de regulación de la expresión génica (Paladini et al. 2014, Vosa et al. 2015, Morini et al. 2016).

Otra aportación interesante recogida en el **Artículo 3** consiste en la generación de un **índice de interacción genética** (el denominado *Interaction Score*) como una medida del efecto de combinar los distintos genotipos de los tres polimorfismos relacionados con los niveles de *VIP*. Esta variable permitiría predecir los niveles netos del péptido en función de la presencia de los distintos alelos menores de cada SNP y, por tanto, potencialmente éstos podrían correlacionarse con *outcomes* clínicos del mismo modo que describimos en el caso

de los niveles séricos de VIP (**Artículo 1**). En efecto, encontramos interacciones entre los polimorfismos, de tal modo que **el incremento de los niveles peptídicos asociados al alelo menor del rs688136 se ve contrarrestado por la presencia de alelos menores de cualquiera de los otros dos SNPs**. De hecho, del mismo modo que polimorfismos presentes en un gen pueden contrarrestar o intensificar los efectos de variantes en otros genes, ejerciendo efectos combinados, aditivos, etc. (Chang et al. 2008, Chen et al. 2015), polimorfismos localizados en diferentes regiones, intrónicas y exónicas, del mismo gen pueden establecer asociaciones que determinen, por ejemplo, la actividad sérica global de una enzima (Eom et al. 2011).

Uno de los campos donde mayor uso se hace de los polimorfismos como herramienta predictiva es en el pronóstico de la respuesta al tratamiento con terapias biológicas, lo cual los convierte en especialmente relevantes en el contexto de la medicina personalizada. Por ejemplo, polimorfismos en el receptor Fc gamma 3A y en la IL-6 predicen la respuesta a terapia con Rituximab y agentes anti-TNF en pacientes con AR (Lee et al. 2014); en psoriasis, una enfermedad inflamatoria crónica que comparte mecanismos fisiopatológicos con la AR, se han identificado polimorfismos en el gen de TNF, de la superfamilia del receptor TNFR1B y de la proteína inducida por TNF, TNFAIP3, predicen la respuesta al bloqueo de esta citocina (Prieto-Perez et al. 2013); en AR, polimorfismos en el gen del transportador de folato reducido 1 se asocian con la eficacia de la terapia con metotrexato (Aslibekyan et al. 2014).

En este sentido, evaluando el poder predictivo de las variantes genéticas en la severidad de la AR, nuestros resultados muestran que la **combinación de genotipos asociada a los niveles más bajos de VIP se asocia a su vez con mayores requerimientos de tratamiento con FAMES**. Estos resultados apoyan a los obtenidos en el **Artículo 1** y, de hecho, son muchos los estudios genéticos que de un modo u otro plasman asociaciones entre polimorfismos y diferentes aspectos predecibles de la AR y otras patologías semejantes. Así, por ejemplo, la combinación de factores clínicos con la presencia de distintos polimorfismos se asocia al desarrollo de mayor severidad en el estatus funcional de pacientes con espondilitis anquilosante (Schiotis et al. 2012). Esta combinación de información clínica de los pacientes con variantes genéticas ha sido empleada en un estudio reciente para el diseño de una herramienta diagnóstica que permite predecir la progresión radiográfica hacia enfermedad severa en pacientes con OA de rodilla (Blanco et al. 2015). Otro estudio de GWAS, en relación con la prognosis de la AR, apunta a la asociación de un alelo menor de un polimorfismo en FOXO3A con formas más leves de la enfermedad a través de la limitación de las respuestas inflamatorias por parte de los monocitos (Lee et al. 2013).

Finalmente, en pacientes con AR se ha descrito la asociación de SNPs en los genes PSORS1C1, PTPN2 y MIR146A con un fenotipo más grave de la enfermedad en términos de estatus de autoanticuerpos y daño radiográfico (Ciccacci et al. 2016).

La heterogeneidad de la AR, como compendio que es de múltiples factores biológicos, psicológicos y sociales, convierte la evaluación de su severidad en todo un reto. Esto implica que los *outcomes* clásicamente valorados en la determinación de la severidad de la enfermedad no siempre muestren la eficacia esperada, más aún en cohortes de pacientes de reciente comienzo. En este sentido, la necesidad de tratamiento es una buena señal subrogada de gravedad (**Artículo 5**) (González-Álvaro et al. 2011).

De nuevo, reflexionamos sobre las posibles limitaciones del trabajo desarrollado en el **Artículo 3**. Por un lado, y tal como cabría esperar, los niveles de VIP en suero no pueden ser completamente explicados por la mera presencia de las variantes genéticas descritas. Así, otros elementos, tales como los cambios epigenéticos, pueden estar involucrados en la modulación de los niveles del péptido y requerirán estudios adicionales para profundizar en los mecanismos reguladores operantes. Por otra parte, los resultados han sido obtenidos en una misma cohorte de pacientes de AR de reciente comienzo. Sin embargo, cabe destacar el valor añadido de la replicación de los resultados en dos subpoblaciones independientes y separadas por un espacio temporal de más de un año. Además, del mismo modo que en el **Artículo 1**, el diseño longitudinal de nuestro estudio nos ha permitido evaluar un número considerable de muestras y controlar más eficientemente las variaciones individuales. Finalmente, al ser la intensidad de tratamiento una variable dependiente del tiempo, está sujeta a cambios en las estrategias terapéuticas y obedece al médico encargado de la prescripción del tratamiento. En todo caso, nuestros análisis han sido debidamente ajustados teniendo en cuenta estos factores y, además, disponemos de una información completa sobre los criterios de actuación terapéutica gracias a la exhaustiva y minuciosa recolección de datos realizada a lo largo de todo el seguimiento.

iii. RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS RECEPTORES DE VIP EN LA AR DE RECIENTE COMIENZO

VIP ejerce sus múltiples acciones biológicas a través de tres receptores: VPAC1, VPAC2 y PAC1. El patrón de expresión de los dos primeros en células del sistema inmune y en FLS de AR y OA ha sido ampliamente caracterizado (Delgado et al. 1996a, Gomariz et al. 2006, Juarranz et al. 2008, Jimeno et al. 2015a, Jimeno et al. 2015c, Carrión et al. 2016). Por otra

parte, resultados previos obtenidos en el modelo murino de artritis y en estudios *ex vivo* con muestras de pacientes con AR demuestran que los efectos antiinflamatorios y protectores de VIP son mediados por VPAC1 y VPAC2 pero no por PAC1 (Delgado et al. 2001, Juarranz et al. 2008). Por todo ello, nuestro estudio se centró en ambos receptores.

En el **Artículo 4**, aportamos nuevas evidencias sobre la relevancia del VIP en el contexto de la AR, a través de la asociación de los niveles de expresión de su recetor VPAC1, en PBMCs de pacientes con AR, con el estatus clínico de dichos pacientes.

En primer lugar, la evaluación de la **expresión** de VPAC1 y VPAC2 en la **visita basal de pacientes con AR**, respecto a **controles sanos**, muestra que la de **VPAC2 es significativamente más alta en AR**, mientras que la de **VPAC1 tiende a ser más baja**, pero sin alcanzar la significación. La señalización de VIP a través de VPAC1 es crítica para el mantenimiento de la tolerancia inmune en la AR. Así, deficiencias en la expresión de este receptor en células inmunes de pacientes se han relacionado con el predominio del perfil Th1 asociado a la enfermedad presumiblemente debido a la presencia de polimorfismos encontrados en el gen de este receptor (Delgado et al. 2008a, Paladini et al. 2014). En la misma línea, monocitos de pacientes con el síndrome de Sjögren expresan mayores niveles de VPAC2, sin cambios en la expresión de VPAC1. En este caso se observa que la desregulación de la expresión de este receptor coincide con alteraciones en la capacidad fagocítica de estas células y que VIP no es capaz de revertir el perfil inflamatorio (Hauk et al. 2014). Dentro de la articulación sinovial, se ha descrito que los FLS de pacientes con AR igualmente muestran una expresión predominante de VPAC2 y que VIP sí es capaz de mediar sus efectos antiinflamatorios a través de dicho receptor (Juarranz et al. 2008).

Por otra parte, a lo largo del seguimiento, la expresión de VPAC1 sufre un incremento progresivo, mientras que VPAC2 experimenta una disminución notable. Demostramos así, por primera vez, la existencia de una **correlación inversa entre la expresión de ambos receptores** a lo largo del curso de la AR temprana, sugiriendo una posible **regulación dinámica** de VPAC1 y VPAC2 a modo de mecanismo compensatorio.

Estudios con ratones deficientes para VPAC2 en modelos de EEA muestran que se produce una polarización hacia el perfil Th1/Th17, lo que conduce al desarrollo de una encefalomiелitis exacerbada (Goetzl et al. 2001, Tan et al. 2015); mientras que ratones transgénicos que sobreexpresan VPAC2 muestran un cambio en la polarización de las células TCD4⁺ hacia un fenotipo Th2 (Voice et al. 2003, Tan et al. 2015). En nuestro caso, la correlación entre la baja expresión basal de VPAC1 y la elevada expresión basal de VPAC2 podría explicarse como un intento de contrarrestar el desequilibrio entre las respuestas

Th1/Th17 y Th2 característico de la AR. Así, en células Th17 polarizadas de pacientes con AR de inicio se ha descrito que la expresión basal de VPAC2 predomina sobre la de VPAC1 (Jimeno et al. 2015c). Además, como hemos comentado, se ha comprobado que cuando la expresión de VPAC1 se ve reducida, VPAC2 es capaz de mediar los efectos antiinflamatorios del péptido (Juarranz et al. 2008). De acuerdo con esta regulación diferencial de ambos receptores, se ha descrito en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica que los macrófagos alveolares, clave en la patogénesis y gravedad de esta enfermedad, experimentan una *up*-regulación de la expresión de VPAC1, superando a VPAC2, si bien ambos receptores son necesarios para la señalización antiinflamatoria óptima (Burian et al. 2010).

Por otro lado, estudiamos la expresión de la IL-6, citocina clave en la patogénesis de la AR y marcador de inflamación sistémica (Nishimoto y Kishimoto 2006, Shimamoto et al. 2013), encontrando una disminución de la misma a lo largo del seguimiento, tal como cabe esperar en respuesta al tratamiento de la enfermedad con FAMEs. Un hecho interesante que describimos en este trabajo es la **correlación negativa entre los niveles de VPAC1 e IL-6**, paralela a la **correlación positiva entre los niveles de esta citocina y el receptor VPAC2**. Este resultado apuntaría hacia el papel del bajo nivel de expresión de VPAC1 como marcador de un proceso inflamatorio más intenso. En un modelo de pancreatitis aguda inducida por LPS se ha observado que el tratamiento con agonistas de VPAC1 consigue reducir los niveles de IL-6 y TNF, atenuando la gravedad de la inflamación. Mientras que, el agonista de VPAC2 no mostró ningún efecto significativo (Kojima et al. 2005).

En relación con la carga inflamatoria de la AR y dado que previamente habíamos postulado la asociación de los niveles de VIP con la actividad de la enfermedad en términos de DAS28 (**Artículo 1**), nos planteamos si la expresión de sus receptores podría también correlacionarse con la actividad de la enfermedad. La disminución del DAS28 observada a lo largo del seguimiento responde, lógicamente, al efecto ejercido por las distintas terapias prescritas a los pacientes (**Artículo 5**). Pero lo verdaderamente interesante es la relación entre los niveles de VPAC1, tanto en términos de mensajero como de proteína, con el índice DAS28. Así, describimos que **pacientes con actividad moderada/alta de la enfermedad son los que muestran los niveles más bajos de VPAC1**, mientras que los pacientes en remisión presentan niveles más elevados de este receptor. Además, la expresión de VPAC1 hace posible distinguir grupos de pacientes con distintos grados de actividad de la enfermedad.

El receptor VPAC1 media efectos anti-proliferativos, inhibiendo la transición G1/S del ciclo celular de las células T naïve humanas y sufre procesos de *down*-regulación en células T

activadas (Lara-Marquez et al. 2001, Anderson y González-Rey 2010, Dorsam et al. 2011). La hiperactividad y la respuesta proliferativa de las células TCD4⁺ es uno de los rasgos característicos de la patogénesis de la AR (Cope et al. 2007). En este contexto, la expresión de VPAC1 podría servir como **indicador de desregulaciones en la activación del sistema inmune**.

Si bien aún se desconoce si los cambios en la expresión de VPAC1 a lo largo del curso evolutivo de la AR son causa o consecuencia de la enfermedad, nuestros resultados apuntan hacia un **papel protector de este receptor**. Esa posible función protectora se sustenta en la multiplicidad y diversidad de actividades que ejerce VIP cuando se une a él. Por un lado, tanto en modelos animales como en humanos, la activación selectiva de VPAC1 parece ser más efectiva controlando la respuesta inmunológica que la respuesta con agonistas de VPAC2 (Delgado et al. 2002a); así, en efecto, se ha comprobado que en el modelo de CIA el tratamiento con agonistas de VPAC1, pero no de VPAC2, reduce la frecuencia de la enfermedad, atenúa los síntomas y previene el deterioro articular (Delgado et al. 2001). En la misma línea, en el modelo de CIA, el tratamiento con agonistas de VPAC1 reduce la producción de mediadores proinflamatorios y el número de células Th1 autorreactivas en las articulaciones (Delgado et al. 2008a). Adicionalmente, no solo en AR sino también en otras enfermedades como la EM y la OA, se ha observado que las células inmunes de los pacientes muestran una expresión reducida de VPAC1 respecto a las de controles sanos, asociada, además, a una menor respuesta a VIP (Sun et al. 2006, Juarranz et al. 2008).

En estrecha asociación con lo anterior, evaluamos también la **actividad global de la enfermedad** valorada tanto por el **paciente** (GDA_{pa}) como por el **médico** (GDA_{ph}). En la práctica, son claras las discrepancias en los resultados obtenidos mediante ambas valoraciones, fundamentalmente debidas al carácter subjetivo de la perspectiva del paciente en términos de dolor e hinchazón de las articulaciones (Studenic et al. 2012). A pesar de esto, la evaluación del paciente ha ido ganando relevancia en la determinación del *outcome* en la AR mostrando un gran valor predictivo (Kirwan et al. 2005, Heiberg et al. 2008) y permitiendo buscar la mejoría no solamente en los objetivos tradicionales de disminución de la actividad sino también en la satisfacción del paciente (Aletaha et al. 2009). En este contexto, es muy interesante que nuestros resultados muestren, con ambos índices, cómo una **mayor actividad se asocia a una menor expresión del receptor VPAC1**. Además, esta asociación ocurre en términos muy similares a los observados para otros biomarcadores séricos de actividad empleados en la práctica clínica, tales como la VSG y la PCR (Robinson y Mao 2016) pero que se ven afectados por un sesgo de género (Castrejón

et al. 2008). Así, observamos que la expresión de VPAC1 correlaciona mejor con la GDA_{pa} y la GDA_{ph} que la VSG.

Finalmente, comprobamos que el tratamiento con FAMES, ya sea en monoterapia o en terapia combinada, aparece asociado a un incremento en la expresión de VPAC1, apuntando a que la regulación de este receptor puede ser sensible a dichas terapias. Una modulación similar por FAMES se ha observado en la expresión de citocinas/quimiocinas y sus correspondientes receptores (Aerts et al. 2010, Eriksson et al. 2013, Zhao et al. 2014). Estos fármacos podrían actuar de forma directa regulando la expresión de VPAC1 en linfocitos y monocitos, pero también de forma indirecta modificando la proporción de células inmunes portadoras de los receptores VPAC1/2 dentro del conjunto de las PBMCs. De hecho, observamos en nuestro estudio como la terapia combinada se asocia con un incremento del número de linfocitos y monocitos y éste con un incremento en los niveles de expresión de VPAC1, mientras que la ratio linfocitos/monocitos no se ve afectada. Además, las terapias con antiinflamatorios pueden alterar la proporción de subpoblaciones linfocíticas específicas que expresen estos receptores. En este contexto, se ha descrito un incremento de la expresión de ambos receptores en células de pacientes con AR polarizadas a Th17 (Jimeno et al. 2015c). Así, cambios en la proporción de subpoblaciones de células T inducidos por el tratamiento podrían desembocar en cambios en la expresión de VPAC1.

Si bien los mecanismos que regulan la expresión de VPAC1 en células inmunes de pacientes con AR sigue siendo desconocido, la predisposición al desarrollo de esta enfermedad sí se ha asociado con un determinado haplotipo en 3'UTR del gen de VPAC1 (Delgado et al. 2008a). En su conjunto, todos los resultados recogidos en el **Artículo 4**, apoyan la **relevancia clínica de la expresión del receptor VPAC1 en la AR temprana**, sirviendo no solo como un **indicador de la actividad** de la enfermedad sino también como una posible diana terapéutica en la AR.

Tenemos a nuestro alcance los medios para lograr que un análisis genético, combinado con la determinación de otros biomarcadores, permita un pronóstico preciso del inicio y la gravedad de las enfermedades reumáticas, de modo que un tratamiento precoz o incluso profiláctico pueda servir como freno a la enfermedad. De acuerdo con toda la información recabada en los **Artículos 1-4** de este trabajo, podría ser que en este panorama que se abre ante nosotros, el eje VIP/Receptores ocupase un lugar relevante como marcador pronóstico de dichas enfermedades.

Conclusiones

V. CONCLUSIONES

1. En pacientes con AR temprana los niveles séricos de VIP no varían a lo largo del seguimiento y, por tanto, dependen del individuo y no de factores externos ni de la fase de la enfermedad.
2. Los niveles séricos de VIP se correlacionan inversamente con la actividad de la enfermedad en pacientes con AR temprana.
3. Pacientes con AR temprana ACPA⁻ con niveles bajos de VIP sérico muestran mayor actividad de la enfermedad que los pacientes ACPA⁻ con niveles normales de VIP. Más aún, pacientes ACPA⁺ con bajos niveles séricos de VIP muestran una clara tendencia a sufrir mayor actividad de la enfermedad y requerir una mayor intensidad de tratamiento con FAMEs que los pacientes ACPA⁺ con niveles normales de este péptido.
4. La determinación de los niveles basales de VIP podría complementar a la medida de los ACPA, sirviendo como biomarcador pronóstico en la AR temprana.
5. En pacientes con EspA temprana los niveles de VIP no varían a lo largo del seguimiento ni existen diferencias entre los niveles basales de los pacientes con EspA y los de pacientes con dolor de espalda crónico inflamatorio.
6. Pacientes con dolor de espalda inflamatorio temprano (EspA temprana) y bajos niveles de VIP en suero experimentan una mayor carga inflamatoria de la enfermedad y una peor evolución, en términos de funcionalidad, durante los dos primeros años del curso de la misma.
7. En dos poblaciones distintas de pacientes con AR temprana, los polimorfismos rs35643203 (intrón 1) y rs12201140 (intrón 4) presentes en el gen de *VIP* se asocian con menores niveles séricos del péptido. Contrariamente, el rs688136 (exón 7- región 3'UTR) se asocia con un incremento en los niveles de VIP en suero.
8. Ensayos funcionales apuntan a que la modulación de la expresión de *VIP* asociada al rs688136 en 3'UTR podría realizarse a través de un mecanismo mediado por el microRNA miR-205-5p.

9. Existe interacción entre las variantes genéticas asociadas a los niveles séricos de VIP. Así, la presencia de alelos asociados a niveles bajos de VIP contrarresta el efecto de los alelos asociados con niveles altos.
10. Determinadas combinaciones de genotipos de dichas variantes en el gen de *VIP* se asocian con una mayor intensidad de tratamiento de los pacientes, apuntando hacia esos polimorfismos como un indicador complementario de la severidad de la AR.
11. A lo largo del seguimiento de una población de pacientes con AR temprana se observa una correlación inversa en la expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2 en células mononucleares de sangre periférica. Así, la disminución de expresión de VPAC1 se correlaciona con un incremento en la expresión de VPAC2, que podría considerarse como un mecanismo compensatorio frente a la desregulación del balance Th1/Th17-Th2.
12. Los niveles de expresión de IL-6, inductor clave del proceso inflamatorio en la AR, disminuyen a lo largo del seguimiento de una población de pacientes con AR temprana. Una inflamación más severa, en términos de expresión de IL-6, se asocia con menor expresión de VPAC1 y mayor expresión de VPAC2.
13. Pacientes con AR temprana y actividad de la enfermedad (DAS28) elevada presentan una expresión reducida de VPAC1. Más aún, la expresión de este receptor permite discriminar entre pacientes con varios grados de actividad. Adicionalmente, la expresión de VPAC1 correlaciona con la valoración global de la enfermedad realizada tanto por el paciente como por el médico.

Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFÍA

Abad, C., C. Martínez, M. G. Juarranz, A. Arranz, J. Leceta, M. Delgado y R. P. Gomariz (2003). *Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease*. *Gastroenterology* 124(4): 961-971.

Abad, C., Y. V. Tan, R. Lopez, H. Nobuta, H. Dong, P. Phan, J. M. Feng, A. T. Campagnoni y J. A. Waschek (2010). *Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(45): 19555-19560.

Abad, C., R. Gomariz, J. Waschek, J. Leceta, C. Martínez, Y. Juarranz y A. Arranz (2012). *VIP in inflammatory bowel disease: state of the art*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 12(4): 316-322.

Abd-Allah, S. H., S. M. Shalaby, H. F. Pasha, A. S. El-Shal y A. M. Abou El-Saoud (2012). *Variation of matrix metalloproteinase 1 and 3 haplotypes and their serum levels in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. *Genet Test Mol Biomarkers* 16(1): 15-20.

Abildtrup, M., G. H. Kingsley y D. L. Scott (2015). *Calprotectin as a biomarker for rheumatoid arthritis: a systematic review*. *J Rheumatol* 42(5): 760-770.

Absood, A., B. Hu, N. Bassily y L. Colletti (2008). *VIP inhibits human HepG2 cell proliferation in vitro*. *Regul Pept* 146(1-3): 285-292.

Aerts, N. E., K. J. De Knop, J. Leysen, D. G. Ebo, C. H. Bridts, J. J. Weyler, W. J. Stevens y L. S. De Clerck (2010). *Increased IL-17 production by peripheral T helper cells after tumour necrosis factor blockade in rheumatoid arthritis is accompanied by inhibition of migration-associated chemokine receptor expression*. *Rheumatology (Oxford)* 49(12): 2264-2272.

Aho, K., M. Heliovaara, J. Maatela, T. Tuomi y T. Palosuo (1991). *Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol* 18(9): 1282-1284.

Ahren, B. (1984). *Influence of VIP on thyroid hormone secretion*. *Peptides* 5(2): 305-307.

Akesson, L., B. Ahren, G. Edgren y E. Degerman (2005). *VPAC2-R mediates the lipolytic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide in*

primary rat adipocytes. *Endocrinology* 146(2): 744-750.

Al-Mossawi, M. H., A. Ridley, S. Kiedel y P. Bowness (2013). *The role of natural killer cells, gamma delta T-cells and other innate immune cells in spondyloarthritis*. *Curr Opin Rheumatol* 25(4): 434-439.

Alamanos, Y. y A. A. Drosos (2005). *Epidemiology of adult rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev* 4(3): 130-136.

Aletaha, D., V. P. Nell, T. Stamm, M. Uffmann, S. Pflugbeil, K. Machold y J. S. Smolen (2005). *Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score*. *Arthritis Res Ther* 7(4): R796-806.

Aletaha, D., J. Funovits, M. M. Ward, J. S. Smolen y T. K. Kvien (2009). *Perception of improvement in patients with rheumatoid arthritis varies with disease activity levels at baseline*. *Arthritis Rheum* 61(3): 313-320.

Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, et al. (2010). *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. *Arthritis Rheum* 62(9): 2569-2581.

Aletaha, D., F. Alasti y J. S. Smolen (2013). *Rheumatoid factor determines structural progression of rheumatoid arthritis dependent and independent of disease activity*. *Ann Rheum Dis* 72(6): 875-880.

Aletaha, D., F. Alasti y J. S. Smolen (2015). *Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials*. *Arthritis Res Ther* 17: 229.

Aliakbari, J., S. P. Sreedharan, C. W. Turck y E. J. Goetzl (1987). *Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils*. *Biochem Biophys Res Commun* 148(3): 1440-1445.

Almodovar, R., V. Rios, S. Ocana, M. Gobbo, M. L. Casas, P. Zarco-Montejo y X. Juanola (2014). *Association of biomarkers of inflammation, cartilage and bone turnover with gender, disease activity, radiological damage and sacroiliitis by magnetic resonance imaging in patients with early spondyloarthritis*. *Clin Rheumatol* 33(2): 237-241.

Alonzo, E. S. y D. B. Sant'Angelo (2011). *Development of PLZF-expressing innate T cells*. *Curr Opin Immunol* 23(2): 220-227.

- Allen, R. L., C. A. O'Callaghan, A. J. McMichael y P. Bowness (1999). *Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure*. J Immunol 162(9): 5045-5048.
- Ambarus, C., N. Yeremenko, P. P. Tak y D. Baeten (2012). *Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory?* Curr Opin Rheumatol 24(4): 351-358.
- Andersen, O., J. Fahrenkrug, C. Wikkelsø y B. B. Johansson (1984). *VIP in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. Peptides 5(2): 435-437.
- Anderson, P. y E. González-Rey (2010). *Vasoactive intestinal peptide induces cell cycle arrest and regulatory functions in human T cells at multiple levels*. Mol Cell Biol 30(10): 2537-2551.
- Appel, H., G. Ruiz-Heiland, J. Listing, J. Zwerina, M. Herrmann, R. Mueller, H. Haibel, X. Baraliakos, A. Hempfing, M. Rudwaleit, J. Sieper y G. Schett (2009). *Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum 60(11): 3257-3262.
- Appel, H., P. Wu, R. Scheer, C. Kedor, B. Sawitzki, A. Thiel, A. Radbruch, J. Sieper y U. Syrbe (2011). *Synovial and peripheral blood CD4+FoxP3+ T cells in spondyloarthritis*. J Rheumatol 38(11): 2445-2451.
- Arend, W. P. y G. S. Firestein (2012). *Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis*. Nat Rev Rheumatol 8(10): 573-586.
- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra y et al. (1988). *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum 31(3): 315-324.
- Arranz, A., I. Gutiérrez-Cañas, M. Carrión, Y. Juarranz, J. L. Pablos, C. Martínez y R. P. Gomariz (2008). *VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Mol Immunol 45(11): 3065-3073.
- Aslibekyan, S., E. E. Brown, R. J. Reynolds, D. T. Redden, S. Morgan, J. E. Baggott, J. Sha, L. W. Moreland, J. R. O'Dell, J. R. Curtis, T. R. Mikuls, S. L. Bridges, Jr. y D. K. Arnett (2014). *Genetic variants associated with methotrexate efficacy and toxicity in early rheumatoid arthritis: results from the treatment of early aggressive rheumatoid arthritis trial*. Pharmacogenomics J 14(1): 48-53.
- Asquith, D. L., A. M. Miller, I. B. McInnes y F. Y. Liew (2009). *Animal models of rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol 39(8): 2040-2044.
- Asquith, M., D. Elewaut, P. Lin y J. T. Rosenbaum (2014). *The role of the gut and microbes in the pathogenesis of spondyloarthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol 28(5): 687-702.
- Atagunduz, P., H. Appel, W. Kuon, P. Wu, A. Thiel, P. M. Kloetzel y J. Sieper (2005). *HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum 52(3): 892-901.
- Australo-Anglo-American Spondyloarthritis, C., J. D. Reveille, A. M. Sims, P. Danoy, D. M. Evans, P. Leo, J. J. Pointon, R. Jin, X. Zhou, L. A. Bradbury, et al. (2010). *Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci*. Nat Genet 42(2): 123-127.
- Baerlecken, N. T., S. Nothdorft, G. H. Stummvoll, J. Sieper, M. Rudwaleit, S. Reuter, T. Matthias, R. E. Schmidt y T. Witte (2014). *Autoantibodies against CD74 in spondyloarthritis*. Ann Rheum Dis 73(6): 1211-1214.
- Baeten, D., H. J. Moller, J. Delanghe, E. M. Veys, S. K. Moestrup y F. De Keyser (2004). *Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis*. Arthritis Rheum 50(5): 1611-1623.
- Baeten, D., X. Baraliakos, J. Braun, J. Sieper, P. Emery, D. van der Heijde, I. McInnes, J. M. van Laar, R. Landewe, P. Wordsworth, et al. (2013). *Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet 382(9906): 1705-1713.
- Baeten, D., J. Sieper, J. Braun, X. Baraliakos, M. Dougados, P. Emery, A. Deodhar, B. Porter, R. Martin, M. Andersson, S. Mpofu, H. B. Richards, M. S. Group y M. S. Group (2015). *Secukinumab, an Interleukin-17A Inhibitor, in Ankylosing Spondylitis*. N Engl J Med 373(26): 2534-2548.
- Bajo, A. M., M. G. Juarranz, P. Valenzuela, P. Martinez, J. C. Prieto y L. G. Guijarro (2000). *Expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human uterus*. Peptides 21(9): 1383-1388.
- Bangale, Y., S. Karle, S. Planque, Y. X. Zhou, H. Taguchi, Y. Nishiyama, L. Li, R. Kalaga y S. Paul (2003). *VIPase autoantibodies in Fas-defective mice and patients with autoimmune disease*. FASEB J 17(6): 628-635.
- Baraliakos, X., J. Listing, J. Brandt, A. Zink, R. Alten, G. Burmester, E. Gromnica-Ihle, H. Kellner, M. Schneider, H. Sorensen, H. Zeidler, M. Rudwaleit, J. Sieper y J. Braun (2005). *Clinical response to discontinuation of anti-TNF therapy in patients with ankylosing spondylitis after 3 years of continuous*

- treatment with infliximab. *Arthritis Res Ther* 7(3): R439-444.
- Baraliakos, X., J. Listing, M. Rudwaleit, J. Sieper y J. Braun (2008). *The relationship between inflammation and new bone formation in patients with ankylosing spondylitis*. *Arthritis Res Ther* 10(5): R104.
- Baraliakos, X., J. Listing, A. von der Recke y J. Braun (2009). *The natural course of radiographic progression in ankylosing spondylitis--evidence for major individual variations in a large proportion of patients*. *J Rheumatol* 36(5): 997-1002.
- Baraliakos, X., N. Baerlecken, T. Witte, F. Heldmann y J. Braun (2014a). *High prevalence of anti-CD74 antibodies specific for the HLA class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in patients with axial spondyloarthritis*. *Ann Rheum Dis* 73(6): 1079-1082.
- Baraliakos, X., H. Haibel, J. Listing, J. Sieper y J. Braun (2014b). *Continuous long-term anti-TNF therapy does not lead to an increase in the rate of new bone formation over 8 years in patients with ankylosing spondylitis*. *Ann Rheum Dis* 73(4): 710-715.
- Baraliakos, X., B. Borah, J. Braun, D. Baeten, D. Laurent, J. Sieper, P. Emery, I. B. McInnes, J. M. van Laar, P. Wordsworth, et al. (2016). *Long-term effects of secukinumab on MRI findings in relation to clinical efficacy in subjects with active ankylosing spondylitis: an observational study*. *Ann Rheum Dis* 75(2): 408-412.
- Bartok, B. y G. S. Firestein (2010). *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. *Immunol Rev* 233(1): 233-255.
- Basille, M., D. Vaudry, Y. Coulouarn, S. Jegou, I. Lihmann, A. Fournier, H. Vaudry y B. Gonzalez (2000). *Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development*. *J Comp Neurol* 425(4): 495-509.
- Bataille, D., P. Freychet y G. Rosselin (1974). *Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase*. *Endocrinology* 95(3): 713-721.
- Bax, M., T. W. Huizinga y R. E. Toes (2014). *The pathogenic potential of autoreactive antibodies in rheumatoid arthritis*. *Semin Immunopathol* 36(3): 313-325.
- Baxter, D., I. B. McInnes y M. Kurowska-Stolarska (2012). *Novel regulatory mechanisms in inflammatory arthritis: a role for microRNA*. *Immunol Cell Biol* 90(3): 288-292.
- Bay-Jensen, A. C., M. A. Karsdal, E. Vassiliadis, S. Wichuk, K. Marcher-Mikkelsen, R. Lories, C. Christiansen y W. P. Maksymowych (2013a). *Circulating citrullinated vimentin fragments reflect disease burden in ankylosing spondylitis and have prognostic capacity for radiographic progression*. *Arthritis Rheum* 65(4): 972-980.
- Bay-Jensen, A. C., S. Wichuk, I. Byrjalsen, D. J. Leeming, N. Morency, C. Christiansen, M. A. Karsdal y W. P. Maksymowych (2013b). *Circulating protein fragments of cartilage and connective tissue degradation are diagnostic and prognostic markers of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis*. *PLoS One* 8(1): e54504.
- Behrens, F., A. Himsel, S. Rehart, J. Stanczyk, B. Beutel, S. Y. Zimmermann, U. Koehl, B. Moller, S. Gay, J. P. Kaltwasser, J. M. Pfeilschifter y H. H. Radeke (2007). *Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis* 66(9): 1151-1156.
- Benjamin, M. y D. McGonagle (2009). *The enthesis organ concept and its relevance to the spondyloarthropathies*. *Adv Exp Med Biol* 649: 57-70.
- Benjamin, R. y P. Parham (1990). *Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis*. *Immunol Today* 11(4): 137-142.
- Bennett, A. N., D. McGonagle, P. O'Connor, E. M. Hensor, F. Sivera, L. C. Coates, P. Emery y H. Marzo-Ortega (2008). *Severity of baseline magnetic resonance imaging-evident sacroiliitis and HLA-B27 status in early inflammatory back pain predict radiographically evident ankylosing spondylitis at eight years*. *Arthritis Rheum* 58(11): 3413-3418.
- Bijlsma, J. W., A. A. Van Everdingen, M. Huisman, R. N. De Nijs y J. W. Jacobs (2002). *Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: effects on erosions and bone*. *Ann N Y Acad Sci* 966: 82-90.
- Biomarkers Definitions Working Group (2001). *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. *Clin Pharmacol Ther* 69(3): 89-95.
- Black, P. H. (2002). *Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation*. *Brain Behav Immun* 16(6): 622-653.
- Blanco, F. J., I. Moller, M. Romera, A. Rozadilla, J. A. Sanchez-Lazaro, A. Rodriguez, J. Galvez, J. Fores, J. Monfort, S. Ojeda, et al. (2015). *Improved prediction of knee osteoarthritis progression by genetic polymorphisms: the Arthrotest Study*. *Rheumatology (Oxford)* 54(7): 1236-1243.

- Bloom, S. R., J. M. Polak y A. G. Pearse (1973). *Vasoactive intestinal peptide and watery-diarrhoea syndrome*. *Lancet* 2(7819): 14-16.
- Bloom, S. R., N. D. Christofides, J. Delamarter, G. Buell, E. Kawashima y J. M. Polak (1983). *Diarrhoea in vipoma patients associated with cosecretion of a second active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by single coding gene*. *Lancet* 2(8360): 1163-1165.
- Bobbio-Pallavicini, F., R. Caporali, C. Alpini, S. Avale, O. M. Epis, C. Klersy y C. Montecucco (2007a). *High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis* 66(3): 302-307.
- Bobbio-Pallavicini, F., R. Caporali, C. Alpini, R. Moratti y C. Montecucco (2007b). *Predictive value of antibodies to citrullinated peptides and rheumatoid factors in anti-TNF-alpha treated patients*. *Ann N Y Acad Sci* 1109: 287-295.
- Bodner, M., M. Fridkin y I. Gozes (1985). *Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(11): 3548-3551.
- Boire G., C. N., de Brum-Fernandes A.J., Liang P., Masetto A., Gui Y., Murphy M., Maksymowych W.P., Marotta A. (2014). *14-3-3eta predicts radiographic progression in recent-onset polyarthritis patients*. *Ann Rheum Dis* 73(Suppl. 2): 603-604.
- Bombardieri, M., N. W. Kam, F. Brentano, K. Choi, A. Filer, D. Kyburz, I. B. McInnes, S. Gay, C. Buckley y C. Pitzalis (2011). *A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells*. *Ann Rheum Dis* 70(10): 1857-1865.
- Boonen, A. (2006). *A review of work-participation, cost-of-illness and cost-effectiveness studies in ankylosing spondylitis*. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(10): 546-553.
- Bos, W. H., L. A. van de Stadt, A. Sohrabian, J. Ronnelid y D. van Schaardenburg (2014). *Development of anti-citrullinated protein antibody and rheumatoid factor isotypes prior to the onset of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther* 16(2): 405.
- Bottini, N. y G. S. Firestein (2013). *Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors*. *Nat Rev Rheumatol* 9(1): 24-33.
- Bowness, P., A. Ridley, J. Shaw, A. T. Chan, I. Wong-Baeza, M. Fleming, F. Cummings, A. McMichael y S. Kollnberger (2011). *Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis*. *J Immunol* 186(4): 2672-2680.
- Bowness, P. (2015). *Hla-B27*. *Annu Rev Immunol* 33: 29-48.
- Braun, J., R. van den Berg, X. Baraliakos, H. Boehm, R. Burgos-Vargas, E. Collantes-Estevez, H. Dagfinrud, B. Dijkmans, M. Dougados, P. Emery, et al. (2011). *2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis*. *Ann Rheum Dis* 70(6): 896-904.
- Braun, J., X. Baraliakos, U. Kiltz, F. Heldmann y J. Sieper (2015). *Classification and diagnosis of axial spondyloarthritis--what is the clinically relevant difference?* *J Rheumatol* 42(1): 31-38.
- Braun, J., X. Baraliakos, A. Deodhar, D. Baeten, J. Sieper, P. Emery, A. Readie, R. Martin, S. Mpofu, H. B. Richards y M. s. group (2017). *Effect of secukinumab on clinical and radiographic outcomes in ankylosing spondylitis: 2-year results from the randomised phase III MEASURE 1 study*. *Ann Rheum Dis* 76(6): 1070-1077.
- Breban, M., F. Costantino, C. Andre, G. Chiochia y H. J. Garchon (2015). *Revisiting MHC genes in spondyloarthritis*. *Curr Rheumatol Rep* 17(6): 516.
- Breban, M., J. Tap, A. Leboime, R. Said-Nahal, P. Langella, G. Chiochia, J. P. Furet y H. Sokol (2017). *Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis*. *Ann Rheum Dis*.
- Brenneman, D. E. y L. E. Eiden (1986). *Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(4): 1159-1162.
- Brenneman, D. E. (2007). *Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. *Peptides* 28(9): 1720-1726.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch y A. Zychlinsky (2004). *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. *Science* 303(5663): 1532-1535.
- Brown, M. A., T. Kenna y B. P. Wordsworth (2016). *Genetics of ankylosing spondylitis--insights into pathogenesis*. *Nat Rev Rheumatol* 12(2): 81-91.
- Brzustewicz, E. y E. Bryl (2015). *The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis--Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy*. *Cytokine* 76(2): 527-536.
- Burgers, L. E., H. W. van Steenbergen, R. M. Ten Brinck, T. W. Huizinga y A. H. van der Helm-van Mil (2017). *Differences in the symptomatic phase preceding ACPA-positive and ACPA-negative RA: a*

longitudinal study in arthralgia during progression to clinical arthritis. Ann Rheum Dis.

Burian, B., A. Storka, B. A. Marzluf, Y. C. Yen, C. Lambers, B. Robibaro, K. Vonbank, W. Mosgoeller y V. Petkov (2010). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor expression in monocyte-derived macrophages from COPD patients.* Peptides 31(4): 603-608.

Burkhardt, R., E. E. Kenny, J. K. Lowe, A. Birkeland, R. Josowitz, M. Noel, J. Salit, J. B. Maller, I. Pe'er, M. J. Daly, D. Altshuler, M. Stoffel, J. M. Friedman y J. L. Breslow (2008). *Common SNPs in HMGCR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon13.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 28(11): 2078-2084.

Burleigh, D. E. y M. R. Banks (2007). *Stimulation of intestinal secretion by vasoactive intestinal peptide and cholera toxin.* Auton Neurosci 133(1): 64-75.

Burmester, G. R., E. Feist y T. Dorner (2014). *Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis.* Nat Rev Rheumatol 10(2): 77-88.

Busto, R., I. Carrero, L. G. Guijarro, R. M. Solano, J. Zapatero, F. Nogueras y J. C. Prieto (1999). *Expression, pharmacological, and functional evidence for PACAP/VIP receptors in human lung.* Am J Physiol 277(1 Pt 1): L42-48.

Caiello, I., G. Minnone, D. Holzinger, T. Vogl, G. Prencipe, A. Manzo, F. De Benedetti y R. Strippoli (2014). *IL-6 amplifies TLR mediated cytokine and chemokine production: implications for the pathogenesis of rheumatic inflammatory diseases.* PLoS One 9(10): e107886.

Calabrese, L. H. y S. Rose-John (2014). *IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease.* Nat Rev Rheumatol 10(12): 720-727.

Calin, A., S. Garrett, H. Whitelock, L. G. Kennedy, J. O'Hea, P. Mallorie y T. Jenkinson (1994). *A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index.* J Rheumatol 21(12): 2281-2285.

Campos-Salinas, J., A. Cavazzuti, F. O'Valle, I. Forte-Lago, M. Caro, S. M. Beverley, M. Delgado y E. González-Rey (2014). *Therapeutic efficacy of stable analogues of vasoactive intestinal peptide against pathogens.* J Biol Chem 289(21): 14583-14599.

Carmona, L., V. Villaverde, C. Hernandez-Garcia, J. Ballina, R. Gabriel, A. Laffon y E. S. Group (2002). *The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain.* Rheumatology (Oxford) 41(1): 88-95.

Carrión, M., Y. Juarranz, S. Pérez-García, R. Jimeno, J. L. Pablos, R. P. Gomariz y I. Gutiérrez-Cañas (2011). *RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide.* Arthritis Rheum 63(6): 1626-1636.

Carrión, M., S. Pérez-García, R. Jimeno, Y. Juarranz, I. González-Álvaro, J. L. Pablos, I. Gutiérrez-Cañas y R. P. Gomariz (2013). *Inflammatory mediators alter interleukin-17 receptor, interleukin-12 and -23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immunomodulation by vasoactive intestinal Peptide.* Neuroimmunomodulation 20(5): 274-284.

Carrión, M., Y. Juarranz, I. V. Seoane, C. Martínez, I. González-Álvaro, J. L. Pablos, I. Gutiérrez-Cañas y R. P. Gomariz (2014). *VIP modulates IL-22R1 expression and prevents the contribution of rheumatoid synovial fibroblasts to IL-22-mediated joint destruction.* J Mol Neurosci 52(1): 10-17.

Carrión, M., S. Pérez-García, C. Martínez, Y. Juarranz, L. Estrada-Capetillo, A. Puig-Kroger, R. P. Gomariz y I. Gutiérrez-Cañas (2016). *VIP impairs acquisition of the macrophage proinflammatory polarization profile.* J Leukoc Biol.

Castrejón, I., A. M. Ortiz, R. García-Vicuña, J. P. López-Bote, A. Humbría, L. Carmona y I. González-Álvaro (2008). *Are the C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rate equivalent when estimating the 28-joint disease activity score in rheumatoid arthritis?* Clin Exp Rheumatol 26(5): 769-775.

Castrejón, I., L. Carmona, A. M. Ortiz, M. A. Belmonte, J. A. Martínez-López y I. González-Álvaro (2013). *Development and validation of a new disease activity index as a numerical sum of four variables in patients with early arthritis.* Arthritis Care Res (Hoboken) 65(4): 518-525.

Castro-Villegas, C., C. Perez-Sanchez, A. Escudero, I. Filipescu, M. Verdu, P. Ruiz-Limon, M. A. Aguirre, Y. Jimenez-Gomez, P. Font, A. Rodriguez-Ariza, et al. (2015). *Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNFalpha.* Arthritis Res Ther 17: 49.

Catrina, A. I., K. D. Deane y J. U. Scher (2016a). *Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis.* Rheumatology (Oxford) 55(3): 391-402.

Catrina, A. I., V. Joshua, L. Klareskog y V. Malmstrom (2016b). *Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis.* Immunol Rev 269(1): 162-174.

Cawston, T. E. y D. A. Young (2010). *Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown.* Cell Tissue Res 339(1): 221-235.

- Centola, M., G. Cavet, Y. Shen, S. Ramanujan, N. Knowlton, K. A. Swan, M. Turner, C. Sutton, D. R. Smith, D. J. Haney, *et al.* (2013). *Development of a multi-biomarker disease activity test for rheumatoid arthritis*. PLoS One 8(4): e60635.
- Ciccacci, C., P. Conigliaro, C. Perricone, S. Rufini, P. Triggianese, C. Politi, G. Novelli, R. Perricone y P. Borgiani (2016). *Polymorphisms in STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 and MIR146A genes are associated differently with prognostic factors in Italian patients affected by rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol 186(2): 157-163.
- Ciccia, F., M. Bombardieri, A. Principato, A. Giardina, C. Tripodo, R. Porcasi, S. Peralta, V. Franco, E. Giardina, A. Craxi, C. Pitzalis y G. Triolo (2009). *Overexpression of interleukin-23, but not interleukin-17, as an immunologic signature of subclinical intestinal inflammation in ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum 60(4): 955-965.
- Claudepierre, P. (2014). *Spondyloarthritis: a window of opportunity?* Joint Bone Spine 81(3): 197-199.
- Clavel, C., L. Nogueira, L. Laurent, C. Iobagiu, C. Vincent, M. Sebbag y G. Serre (2008). *Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcgamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen*. Arthritis Rheum 58(3): 678-688.
- Colbert, R. A., M. L. DeLay, G. Layh-Schmitt y D. P. Sowders (2009). *HLA-B27 misfolding and spondyloarthropathies*. Prion 3(1): 15-26.
- Colbert, R. A., M. L. DeLay, E. I. Klenk y G. Layh-Schmitt (2010). *From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER*. Immunol Rev 233(1): 181-202.
- Colmegna, I., B. R. Ohata y H. A. Menard (2012). *Current understanding of rheumatoid arthritis therapy*. Clin Pharmacol Ther 91(4): 607-620.
- Conus, S. y H. U. Simon (2010). *Cathepsins and their involvement in immune responses*. Swiss Med Wkly 140: w13042.
- Cope, A. P., H. Schulze-Koops y M. Aringer (2007). *The central role of T cells in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol 25(5 Suppl 46): S4-11.
- Correa, M. V., M. O. da Costa Rocha, G. R. de Sousa, M. do Carmo Pereira Nunes, K. J. Gollob, W. O. Dutra y C. A. da Silva Menezes (2013). *Low levels of vasoactive intestinal peptide are associated with Chagas disease cardiomyopathy*. Hum Immunol 74(10): 1375-1381.
- Cortes, A., W. P. Maksymowych, B. P. Wordsworth, R. D. Inman, P. Danoy, P. Rahman, M. A. Stone, M. Corr, L. S. Gensler, D. Gladman, *et al.* (2015). *Association study of genes related to bone formation and resorption and the extent of radiographic change in ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis 74(7): 1387-1393.
- Couvineau, A. y M. Laburthe (2012a). *The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins*. Curr Drug Targets 13(1): 103-115.
- Couvineau, A. y M. Laburthe (2012b). *VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins*. Br J Pharmacol 166(1): 42-50.
- Croft, A. P., A. J. Naylor, J. L. Marshall, D. L. Hardie, B. Zimmermann, J. Turner, G. Desanti, H. Adams, A. I. Yemm, U. Muller-Ladner, J. M. Dayer, E. Neumann, A. Filer y C. D. Buckley (2016). *Rheumatoid synovial fibroblasts differentiate into distinct subsets in the presence of cytokines and cartilage*. Arthritis Res Ther 18(1): 270.
- Crotti, T. N., A. A. Dharmapatri, E. Alias y D. R. Haynes (2015). *Osteoimmunology: Major and Costimulatory Pathway Expression Associated with Chronic Inflammatory Induced Bone Loss*. J Immunol Res 2015: 281287.
- Cutolo, M., R. H. Straub y J. W. Bijlsma (2007). *Neuroendocrine-immune interactions in synovitis*. Nat Clin Pract Rheumatol 3(11): 627-634.
- Cutz, E., W. Chan, N. S. Track, A. Goth y S. I. Said (1978). *Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators*. Nature 275(5681): 661-662.
- Chan, A. T., S. D. Kollnberger, L. R. Wedderburn y P. Bowness (2005). *Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis*. Arthritis Rheum 52(11): 3586-3595.
- Chang, K. H., C. C. Hsu, C. H. Muo, C. Y. Hsu, H. C. Liu, C. H. Kao, C. Y. Chen, M. Y. Chang y C. Hsu (2016). *Air pollution exposure increases the risk of rheumatoid arthritis: A longitudinal and nationwide study*. Environ Int 94: 495-499.
- Chang, S. T., J. J. Linderman y D. E. Kirschner (2008). *Effect of multiple genetic polymorphisms on antigen presentation and susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection*. Infect Immun 76(7): 3221-3232.
- Chatzidionysiou, K., E. Lie, E. Nasonov, G. Lukina, M. L. Hetland, U. Tarp, C. Gabay, P. L. van Riel, D. C. Nordstrom, J. Gomez-Reino, K. Pavelka, M. Tomsic, T. K. Kvien y R. F. van Vollenhoven (2011). *Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in*

those for whom no more than one previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries. *Ann Rheum Dis* 70(9): 1575-1580.

Chen, L., R. Fischer, Y. Peng, E. Reeves, K. McHugh, N. Ternette, T. Hanke, T. Dong, T. Elliott, N. Shastri, S. Kollnberger, E. James, B. Kessler y P. Bowness (2014). *Critical role of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 in determining the length and sequence of peptides bound and presented by HLA-B27*. *Arthritis Rheumatol* 66(2): 284-294.

Chen, X., Z. Hu, W. Li, P. Wu, M. Liu, L. Bao, M. Wu, S. Fang, W. Xiong, M. Chen y G. Wu (2015). *Synergistic combined effect between CD40-1C>T and CTLA-4+6230G>A polymorphisms in Graves' disease*. *Gene* 567(2): 154-158.

Cheung, T. T. y I. B. McInnes (2017). *Future therapeutic targets in rheumatoid arthritis?* *Semin Immunopathol*.

Choy, E. (2004). *Clinical experience with inhibition of interleukin-6*. *Rheum Dis Clin North Am* 30(2): 405-415, viii.

Choy, E. (2012). *Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)* 51 Suppl 5: v3-11.

Choy, E. H., A. F. Kavanaugh y S. A. Jones (2013). *The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA*. *Nat Rev Rheumatol* 9(3): 154-163.

Christophe, J. P., T. P. Conlon y J. D. Gardner (1976). *Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig. Binding of radioiodinated peptide*. *J Biol Chem* 251(15): 4629-4634.

Christopoulos, A., G. Christopoulos, M. Morfis, M. Udawela, M. Laburthe, A. Couvineau, K. Kuwasako, N. Tilakaratne y P. M. Sexton (2003). *Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins*. *J Biol Chem* 278(5): 3293-3297.

Chu, T. G. y M. Orłowski (1985). *Soluble metalloendopeptidase from rat brain: action on enkephalin-containing peptides and other bioactive peptides*. *Endocrinology* 116(4): 1418-1425.

Chung, H. Y., P. Machado, D. van der Heijde, M. A. D'Agostino y M. Dougados (2011). *HLA-B27 positive patients differ from HLA-B27 negative patients in clinical presentation and imaging: results from the DESIR cohort of patients with recent onset axial spondyloarthritis*. *Ann Rheum Dis* 70(11): 1930-1936.

Daltroy, L. H., M. G. Larson, N. W. Roberts y M. H. Liang (1990). *A modification of the Health Assessment Questionnaire for the*

spondyloarthropathies. *J Rheumatol* 17(7): 946-950.

Danve, A. y A. Deodhar (2017). *Treat to Target in Axial Spondyloarthritis: What Are the Issues?* *Curr Rheumatol Rep* 19(5): 22.

Daoussis, D., S. N. Liossis, E. E. Solomou, A. Tsanakti, K. Bounia, M. Karampetsou, G. Yiannopoulos y A. P. Andonopoulos (2010). *Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis*. *Arthritis Rheum* 62(1): 150-158.

Das, S., E. M. Vital, S. Horton, D. Bryer, Y. El-Sherbiny, A. C. Rawstron, F. Ponchel, P. Emery y M. H. Buch (2014). *Abatacept or tocilizumab after rituximab in rheumatoid arthritis? An exploratory study suggests non-response to rituximab is associated with persistently high IL-6 and better clinical response to IL-6 blocking therapy*. *Ann Rheum Dis* 73(5): 909-912.

Davidson, S. I., Y. Liu, P. A. Danoy, X. Wu, G. P. Thomas, L. Jiang, L. Sun, N. Wang, J. Han, H. Han, C. Australo-Anglo-American Spondyloarthritis, P. M. Visscher, M. A. Brown y H. Xu (2011). *Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese*. *Ann Rheum Dis* 70(2): 289-292.

Dayer, J. M. y E. Choy (2010). *Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor*. *Rheumatology (Oxford)* 49(1): 15-24.

de Aquino, S. G., S. Abdollahi-Roodsaz, M. I. Koenders, F. A. van de Loo, G. J. Pruijn, R. J. Marijnissen, B. Walgreen, M. M. Helsen, L. A. van den Bersselaar, R. S. de Molon, M. J. Avila Campos, F. Q. Cunha, J. A. Cirelli y W. B. van den Berg (2014). *Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response*. *J Immunol* 192(9): 4103-4111.

de Hair, M. J., M. G. van de Sande, T. H. Ramwadhoebe, M. Hansson, R. Landewe, C. van der Leij, M. Maas, G. Serre, D. van Schaardenburg, L. Klareskog, D. M. Gerlag, L. G. van Baarsen y P. P. Tak (2014). *Features of the synovium of individuals at risk of developing rheumatoid arthritis: implications for understanding preclinical rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheumatol* 66(3): 513-522.

de Rooy, D. P., M. P. van der Linden, R. Knevel, T. W. Huizinga y A. H. van der Helm-van Mil (2011). *Predicting arthritis outcomes--what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic?* *Rheumatology (Oxford)* 50(1): 93-100.

De Vadder, F., F. Plessier, A. Gautier-Stein y G. Mithieux (2015). *Vasoactive intestinal peptide is a local mediator in a gut-brain neural axis activating intestinal gluconeogenesis*. *Neurogastroenterol Motil* 27(3): 443-448.

- de Vlam, K. (2010). *Soluble and tissue biomarkers in ankylosing spondylitis*. Best Pract Res Clin Rheumatol 24(5): 671-682.
- de Vries-Bouwstra, J. K., Y. P. Goekoop-Ruiterman, K. N. Verpoort, G. M. Schreuder, J. A. Ewals, J. P. Terwiel, H. K. Ronda, P. J. Kerstens, R. E. Toes, R. R. de Vries, F. C. Breedveld, B. A. Dijkmans, T. W. Huizinga y C. F. Allaart (2008). *Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies*. Arthritis Rheum 58(5): 1293-1298.
- de Vries, M. K., I. C. van Eijk, I. E. van der Horst-Bruinsma, M. J. Peters, M. T. Nurmohamed, B. A. Dijkmans, B. P. Hazenberg y G. J. Wolbink (2009). *Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein level, and serum amyloid A protein for patient selection and monitoring of anti-tumor necrosis factor treatment in ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum 61(11): 1484-1490.
- Deane, K. D., C. I. O'Donnell, W. Hueber, D. S. Majka, A. A. Lazar, L. A. Derber, W. R. Gilliland, J. D. Edison, J. M. Norris, W. H. Robinson y V. M. Holers (2010). *The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner*. Arthritis Rheum 62(11): 3161-3172.
- DeLay, M. L., M. J. Turner, E. I. Klenk, J. A. Smith, D. P. Sowders y R. A. Colbert (2009). *HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats*. Arthritis Rheum 60(9): 2633-2643.
- Delgado, M., C. Martínez, M. C. Johnson, R. P. Gomariz y D. Ganea (1996a). *Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes*. J Neuroimmunol 68(1-2): 27-38.
- Delgado, M., C. Martínez, J. Leceta, E. Garrido y R. P. Gomariz (1996b). *Differential VIP and VIP1 receptor gene expression in rat thymocyte subsets*. Peptides 17(5): 803-807.
- Delgado, M., D. Pozo, C. Martinez, E. Garrido, J. Leceta, J. R. Calvo y R. P. Gomariz (1996c). *Characterization of gene expression of VIP and VIP1-receptor in rat peritoneal lymphocytes and macrophages*. Regul Pept 62(2-3): 161-166.
- Delgado, M. y D. Ganea (1999). *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit interleukin-12 transcription by regulating nuclear factor kappaB and Ets activation*. J Biol Chem 274(45): 31930-31940.
- Delgado, M., W. Sun, J. Leceta y D. Ganea (1999). *VIP and PACAP differentially regulate the costimulatory activity of resting and activated macrophages through the modulation of B7.1 and B7.2 expression*. J Immunol 163(8): 4213-4223.
- Delgado, M. y D. Ganea (2000). *Inhibition of IFN-gamma-induced janus kinase-1-STAT1 activation in macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. J Immunol 165(6): 3051-3057.
- Delgado, M., C. Abad, C. Martínez, J. Leceta y R. P. Gomariz (2001). *Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease*. Nat Med 7(5): 563-568.
- Delgado, M. y D. Ganea (2001). *Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine?* J Immunol 166(5): 2907-2912.
- Delgado, M., C. Abad, C. Martinez, M. G. Juarranz, A. Arranz, R. P. Gomariz y J. Leceta (2002a). *Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases*. J Mol Med (Berl) 80(1): 16-24.
- Delgado, M., C. Abad, C. Martínez, M. G. Juarranz, A. Arranz, R. P. Gomariz y J. Leceta (2002b). *Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases*. J Mol Med (Berl) 80(1): 16-24.
- Delgado, M. y D. Ganea (2003). *Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation*. FASEB J 17(8): 944-946.
- Delgado, M., E. González-Rey y D. Ganea (2004). *VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells*. FASEB J 18(12): 1453-1455.
- Delgado, M., G. Robledo, B. Rueda, N. Varela, F. O'Valle, P. Hernandez-Cortes, M. Caro, G. Orozco, E. González-Rey y J. Martin (2008a). *Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells*. Arthritis Rheum 58(4): 1010-1019.
- Delgado, M., M. G. Toscano, K. Benabdellah, M. Cobo, F. O'Valle, E. González-Rey y F. Martin (2008b). *In vivo delivery of lentiviral vectors expressing vasoactive intestinal peptide complementary DNA as gene therapy for collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum 58(4): 1026-1037.
- Delgado, M., N. Varela y E. González-Rey (2008c). *Vasoactive intestinal peptide protects against beta-amyloid-induced neurodegeneration by inhibiting microglia activation at multiple levels*. Glia 56(10): 1091-1103.

- Delgado, M. y D. Ganea (2011). *Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions*. *Amino Acids* 45(1): 25-39.
- Diarra, D., M. Stolina, K. Polzer, J. Zwerina, M. S. Ominsky, D. Dwyer, A. Korb, J. Smolen, M. Hoffmann, C. Scheinecker, et al. (2007). *Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling*. *Nat Med* 13(2): 156-163.
- Dickson, L., I. Aramori, J. McCulloch, J. Sharkey y K. Finlayson (2006). *A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signalling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology*. *Neuropharmacology* 51(6): 1086-1098.
- Dickson, L. y K. Finlayson (2009). *VPAC and PAC receptors: From ligands to function*. *Pharmacol Ther* 121(3): 294-316.
- Dinsmore, W. W., C. Gingell, G. Hackett, P. Kell, D. Savage, R. Oakes y G. D. Frentz (1999). *Treating men with predominantly nonpsychogenic erectile dysfunction with intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide and phentolamine mesylate in a novel auto-injector system: a multicentre double-blind placebo-controlled study*. *BJU Int* 83(3): 274-279.
- Dogrukol-Ak, D., F. Tore y N. Tuncel (2004). *Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects*. *Curr Pharm Des* 10(12): 1325-1340.
- Dong, M., D. I. Pinon, Y. W. Asmann y L. J. Miller (2006). *Possible endogenous agonist mechanism for the activation of secretin family G protein-coupled receptors*. *Mol Pharmacol* 70(1): 206-213.
- Dorsam, G. P., K. Benton, J. Failing y S. Batra (2011). *Vasoactive intestinal peptide signaling axis in human leukemia*. *World J Biol Chem* 2(6): 146-160.
- Dougados, M., A. Gueguen, J. P. Nakache, P. Velicitat, H. Zeidler, E. Veys y A. Calin (1999). *Clinical relevance of C-reactive protein in axial involvement of ankylosing spondylitis*. *J Rheumatol* 26(4): 971-974.
- Dougados, M., D. Aletaha y P. van Riel (2007). *Disease activity measures for rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Rheumatol* 25(5 Suppl 46): S22-29.
- Dougados, M. y D. Baeten (2011). *Spondyloarthritis*. *The Lancet* 377(9783): 2127-2137.
- DuPage, M. y J. A. Bluestone (2016). *Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease*. *Nat Rev Immunol* 16(3): 149-163.
- Duroux-Richard, I., Y. M. Pers, S. Fabre, M. Ammari, D. Baeten, G. Cartron, I. Touitou, C. Jorgensen y F. Apparailly (2014). *Circulating miRNA-125b is a potential biomarker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis*. *Mediators Inflamm* 2014: 342524.
- Eastman, P. S., W. C. Manning, F. Qureshi, D. Haney, G. Cavet, C. Alexander y L. K. Hesterberg (2012). *Characterization of a multiplex, 12-biomarker test for rheumatoid arthritis*. *J Pharm Biomed Anal* 70: 415-424.
- El-Sayed, Z. A., G. A. Mostafa, G. S. Aly, G. S. El-Shahed, M. M. El-Aziz y S. M. El-Emam (2009). *Cardiovascular autonomic function assessed by autonomic function tests and serum autonomic neuropeptides in Egyptian children and adolescents with rheumatic diseases*. *Rheumatology (Oxford)* 48(7): 843-848.
- Elmesmari, A., A. R. Fraser, C. Wood, D. Gilchrist, D. Vaughan, L. Stewart, C. McSharry, I. B. McInnes y M. Kurowska-Stolarska (2016). *MicroRNA-155 regulates monocyte chemokine and chemokine receptor expression in Rheumatoid Arthritis*. *Rheumatology (Oxford)* 55(11): 2056-2065.
- Eom, S. Y., Y. S. Kim, C. J. Lee, C. H. Lee, Y. D. Kim y H. Kim (2011). *Effects of intronic and exonic polymorphisms of paraoxonase 1 (PON1) gene on serum PON1 activity in a Korean population*. *J Korean Med Sci* 26(6): 720-725.
- Eriksson, C., S. Rantapaa-Dahlqvist y K. G. Sundqvist (2013). *Changes in chemokines and their receptors in blood during treatment with the TNF inhibitor infliximab in patients with rheumatoid arthritis*. *Scand J Rheumatol* 42(4): 260-265.
- EULAR (2009). *10 things you should know about rheumatic diseases*. The European League Against Rheumatism.
- EULAR (2016). *The European League Against Rheumatism Annual Congress (London)*.
- Evans, D. M., C. C. Spencer, J. J. Pointon, Z. Su, D. Harvey, G. Kochan, U. Oppermann, A. Dilthey, M. Pirinen, M. A. Stone, et al. (2011). *Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility*. *Nat Genet* 43(8): 761-767.
- Eyre, S., G. Orozco y J. Worthington (2017). *The genetics revolution in rheumatology: large scale genomic arrays and genetic mapping*. *Nat Rev Rheumatol*.
- Fantini, J., A. Tirard, A. el Battari, J. Luis, J. M. Muller, J. Pichon y J. Marvaldi (1985). *[The intestinal immune system. The VIP receptor on T lymphocytes: a new marker of differentiation?]*. *Gastroenterol Clin Biol* 9(12): 929-935.

- Feldtkeller, E., M. A. Khan, D. van der Heijde, S. van der Linden y J. Braun (2003). *Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis*. *Rheumatol Int* 23(2): 61-66.
- Fernandez-Martinez, A. B., A. M. Bajo, M. Isabel Arenas, M. Sanchez-Chapado, J. C. Prieto y M. J. Carmena (2010). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces malignant transformation of the human prostate epithelial cell line RWPE-1*. *Cancer Lett* 299(1): 11-21.
- Fernandez-Montesinos, R., P. M. Castillo, R. Klippstein, E. González-Rey, J. A. Mejias, A. P. Zaderenko y D. Pozo (2009). *Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles*. *Nanomedicine (Lond)* 4(8): 919-930.
- Ferreiro-Iglesias, A., A. Montes, E. Perez-Pampin, J. D. Cañete, E. Raya, C. Magro-Checa, Y. Vasilopoulos, T. Sarafidou, R. Caliz, M. A. Ferrer, et al. (2016). *Replication of PTPRC as genetic biomarker of response to TNF inhibitors in patients with rheumatoid arthritis*. *Pharmacogenomics J* 16(2): 137-140.
- Filer, A., L. S. C. Ward, S. Kemble, C. S. Davies, H. Munir, R. Rogers, K. Raza, C. D. Buckley, G. B. Nash y H. M. McGettrick (2017). *Identification of a transitional fibroblast function in very early rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*.
- Finckh, A., N. Bansback, C. A. Marra, A. H. Anis, K. Michaud, S. Lubin, M. White, S. Sizto y M. H. Liang (2009). *Treatment of very early rheumatoid arthritis with symptomatic therapy, disease-modifying antirheumatic drugs, or biologic agents: a cost-effectiveness analysis*. *Ann Intern Med* 151(9): 612-621.
- Finzel, S., S. Kraus, S. Schmidt, A. Hueber, J. Rech, K. Engelke, M. Englbrecht y G. Schett (2013). *Bone anabolic changes progress in psoriatic arthritis patients despite treatment with methotrexate or tumour necrosis factor inhibitors*. *Ann Rheum Dis* 72(7): 1176-1181.
- Firestein, G. S. (2003). *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. *Nature* 423(6937): 356-361.
- Firestein, G. S. (2014). *The disease formerly known as rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther* 16(3): 114.
- Firestein, G. S. y I. B. McInnes (2017). *Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis*. *Immunity* 46(2): 183-196.
- Foey, A. D., S. Field, S. Ahmed, A. Jain, M. Feldmann, F. M. Brennan y R. Williams (2003). *Impact of VIP and cAMP on the regulation of TNF-alpha and IL-10 production: implications for rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther* 5(6): R317-328.
- Fraccaroli, L., E. Grasso, V. Hauk, D. Paparini, E. Soczewski, G. Mor, C. Perez Leiros y R. Ramhorst (2015). *VIP boosts regulatory T cell induction by trophoblast cells in an in vitro model of trophoblast-maternal leukocyte interaction*. *J Leukoc Biol* 98(1): 49-58.
- Frisell, T., K. Hellgren, L. Alfredsson, S. Raychaudhuri, L. Klareskog y J. Askling (2016). *Familial aggregation of arthritis-related diseases in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: a register-based case-control study in Sweden*. *Ann Rheum Dis* 75(1): 183-189.
- Fujimori, N., T. Oono, H. Igarashi, T. Ito, T. Nakamura, M. Uchida, D. H. Coy, R. T. Jensen y R. Takayanagi (2011). *Vasoactive intestinal peptide reduces oxidative stress in pancreatic acinar cells through the inhibition of NADPH oxidase*. *Peptides* 32(10): 2067-2076.
- Furst, D. E., J. Kay, M. C. Wasko, E. Keystone, A. Kavanaugh, A. Deodhar, F. T. Murphy, J. H. Magnus, E. C. Hsia, B. Hsu, S. Xu, M. U. Rahman y M. K. Doyle (2013). *The effect of golimumab on haemoglobin levels in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or ankylosing spondylitis*. *Rheumatology (Oxford)* 52(10): 1845-1855.
- Furst, D. E. y P. Emery (2014). *Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets*. *Rheumatology (Oxford)* 53(9): 1560-1569.
- Gaffen, S. L., R. Jain, A. V. Garg y D. J. Cua (2014). *The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing*. *Nat Rev Immunol* 14(9): 585-600.
- Gagliani, N., M. C. Amezcua Vesely, A. Iseppon, L. Brockmann, H. Xu, N. W. Palm, M. R. de Zoete, P. Licona-Limon, R. S. Paiva, T. Ching, et al. (2015). *Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation*. *Nature* 523(7559): 221-225.
- Gamet, L., J. C. Murat, A. Remaury, C. Remesy, P. Valet, H. Paris y C. Denis-Pouxviel (1992). *Vasoactive intestinal peptide and forskolin regulate proliferation of the HT29 human colon adenocarcinoma cell line*. *J Cell Physiol* 150(3): 501-509.
- Gan, R. W., L. A. Trouw, J. Shi, R. E. Toes, T. W. Huizinga, M. K. Demoruelle, J. R. Kolfsenbach, G. O. Zerbe, K. D. Deane, J. D. Edison, W. R. Gilliland, J. M. Norris y V. M. Holers (2015). *Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis*. *J Rheumatol* 42(4): 572-579.

- Ganea, D., K. M. Hooper y W. Kong (2015). *The neuropeptide vasoactive intestinal peptide: direct effects on immune cells and involvement in inflammatory and autoimmune diseases*. *Acta Physiol (Oxf)* 213(2): 442-452.
- Gao, J. W., K. F. Zhang, J. S. Lu y T. Su (2015). *Serum matrix metalloproteinases-3 levels in patients with ankylosing spondylitis*. *Genet Mol Res* 14(4): 17068-17078.
- Garg, N., F. van den Bosch y A. Deodhar (2014). *The concept of spondyloarthritis: where are we now?* *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28(5): 663-672.
- Garrett, S., T. Jenkinson, L. G. Kennedy, H. Whitelock, P. Gaisford y A. Calin (1994). *A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*. *J Rheumatol* 21(12): 2286-2291.
- Gauthy, R. (2007). *Musculoskeletal disorders. An ill-understood "pandemic"*. European Trade Union Institute for Research, Education, Health and Safety (ETUI-REHS). Health and Safety Department.: 56.
- Geenen, R., S. Newman, E. R. Bossema, J. E. Vriezekolk y P. A. Boelen (2012). *Psychological interventions for patients with rheumatic diseases and anxiety or depression*. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 26(3): 305-319.
- Gerlag, D. M., K. Raza, L. G. van Baarsen, E. Brouwer, C. D. Buckley, G. R. Burmester, C. Gabay, A. I. Catrina, A. P. Cope, F. Cornelis, et al. (2012). *EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis*. *Ann Rheum Dis* 71(5): 638-641.
- Giachetti, A., S. I. Said, R. C. Reynolds y F. C. Koniges (1977). *Vasoactive intestinal polypeptide in brain: localization in and release from isolated nerve terminals*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8): 3424-3428.
- Gill, T., M. Asquith, J. T. Rosenbaum y R. A. Colbert (2015). *The intestinal microbiome in spondyloarthritis*. *Curr Opin Rheumatol* 27(4): 319-325.
- Girschick, H. J., L. Guilherme, R. D. Inman, K. Latsch, M. Rihl, Y. Sherer, Y. Shoenfeld, H. Zeidler, S. Arienti y A. Doria (2008). *Bacterial triggers and autoimmune rheumatic diseases*. *Clin Exp Rheumatol* 26(1 Suppl 48): S12-17.
- Glass, D. A., 2nd, P. Bialek, J. D. Ahn, M. Starbuck, M. S. Patel, H. Clevers, M. M. Taketo, F. Long, A. P. McMahon, R. A. Lang y G. Karsenty (2005). *Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation*. *Dev Cell* 8(5): 751-764.
- Gobeil, F., A. Fortier, T. Zhu, M. Bossolasco, M. Leduc, M. Grandbois, N. Heveker, G. Bkaily, S. Chemtob y D. Barbaz (2006). *G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm*. *Can J Physiol Pharmacol* 84(3-4): 287-297.
- Godfrin-Valnet, M., M. Puyraveau, C. Prati y D. Wendling (2015). *Flare in spondyloarthritis: Thresholds of disease activity variations*. *Joint Bone Spine* 82(3): 192-195.
- Goetzl, E. J. y S. P. Sreedharan (1992). *Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems*. *FASEB J* 6(9): 2646-2652.
- Goetzl, E. J., J. K. Voice, S. Shen, G. Dorsam, Y. Kong, K. M. West, C. F. Morrison y A. J. Harmar (2001). *Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for vasoactive intestinal peptide*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13854-13859.
- Gomariz, R. P., M. J. Lorenzo, L. Cacicedo, A. Vicente y A. G. Zapata (1990). *Demonstration of immunoreactive vasoactive intestinal peptide (IR-VIP) and somatostatin (IR-SOM) in rat thymus*. *Brain Behav Immun* 4(2): 151-161.
- Gomariz, R. P., M. De La Fuente, A. Hernanz y J. Leceta (1992). *Occurrence of vasoactive intestinal peptide (VIP) in lymphoid organs from rat and mouse*. *Ann N Y Acad Sci* 650: 13-18.
- Gomariz, R. P., M. Delgado, J. R. Naranjo, B. Mellstrom, A. Tormo, F. Mata y J. Leceta (1993). *VIP gene expression in rat thymus and spleen*. *Brain Behav Immun* 7(4): 271-278.
- Gomariz, R. P., E. Garrido, J. Leceta, C. Martínez, R. Abalo y M. Delgado (1994a). *Gene expression of VIP receptor in rat lymphocytes*. *Biochem Biophys Res Commun* 203(3): 1599-1604.
- Gomariz, R. P., J. Leceta, E. Garrido, T. Garrido y M. Delgado (1994b). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat T and B lymphocytes*. *Regul Pept* 50(2): 177-184.
- Gomariz, R. P., C. Martínez, C. Abad, J. Leceta y M. Delgado (2001). *Immunology of VIP: a review and therapeutic perspectives*. *Curr Pharm Des* 7(2): 89-111.
- Gomariz, R. P., A. Arranz, C. Abad, M. Torroba, C. Martínez, F. Rosignoli, M. García-Gómez, J. Leceta y Y. Juarranz (2005). *Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP*. *J Leukoc Biol* 78(2): 491-502.

- Gomariz, R. P., Y. Juarranz, C. Abad, A. Arranz, J. Leceta y C. Martínez (2006). *VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy*. Ann N Y Acad Sci 1070: 51-74.
- González-Álvarez, I., A. M. Ortiz, J. M. Álvarez-Gracia, S. Castañeda, B. Díaz-Sánchez, I. Carvajal, J. A. García-Vadillo, A. Humbría, J. P. López-Bote, E. Patino, E. G. Tomero, E. F. Vicente, P. Sabando y R. García-Vicuña (2011). *Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis*. PLoS One 6(12): e29492.
- González-Rey, E., A. Chorny y M. Delgado (2006a). *VIP: an agent with license to kill infective parasites*. Ann N Y Acad Sci 1070: 303-308.
- González-Rey, E., A. Fernández-Martín, A. Chorny y M. Delgado (2006b). *Vasoactive intestinal peptide induces CD4⁺, CD25⁺ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum 54(3): 864-876.
- González-Rey, E., P. Anderson y M. Delgado (2007a). *Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: a new approach for autoimmune therapy*. Ann Rheum Dis 66 Suppl 3: iii70-76.
- González-Rey, E., A. Chorny y M. Delgado (2007b). *Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides*. Nat Rev Immunol 7(1): 52-63.
- González-Rey, E. y M. Delgado (2008). *Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells*. Brain Behav Immun 22(1): 35-41.
- Goulielmos, G. N., M. I. Zervou, E. Myrthianou, A. Burska, T. B. Niewold y F. Ponchel (2016). *Genetic data: The new challenge of personalized medicine, insights for rheumatoid arthritis patients*. Gene 583(2): 90-101.
- Gozes, I., M. Bodner, Y. Shani y M. Fridkin (1986). *Structure and expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in a human tumor*. Peptides 7 Suppl 1: 1-6.
- Gozes, I., A. Bardea, A. Reshef, R. Zamostiano, S. Zhukovsky, S. Rubinraut, M. Fridkin y D. E. Brenneman (1996). *Neuroprotective strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(1): 427-432.
- Granoth, R., M. Fridkin y I. Gozes (2000). *VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes*. FEBS Lett 475(2): 78-83.
- Grevers, L. C., T. J. de Vries, V. Everts, J. S. Verbeek, W. B. van den Berg y P. L. van Lent (2013). *Immune complex-induced inhibition of osteoclastogenesis is mediated via activating but not inhibitory Fcγ receptors on myeloid precursor cells*. Ann Rheum Dis 72(2): 278-285.
- Groneberg, D. A., J. Springer y A. Fischer (2001). *Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma*. Pulm Pharmacol Ther 14(5): 391-401.
- Guan, C. X., Y. R. Cui, G. Y. Sun, F. Yu, C. Y. Tang, Y. C. Li, H. J. Liu y X. Fang (2009). *Role of CREB in vasoactive intestinal peptide-mediated wound healing in human bronchial epithelial cells*. Regul Pept 153(1-3): 64-69.
- Gudmann, N. S., A. S. Siebuhr, A. F. Christensen, L. Ejstrup, G. L. Sorensen, A. G. Loft, M. A. Karsdal, A. C. Bay-Jensen, H. L. Munk y P. Junker (2017). *Type I and III collagen turnover is increased in axial spondyloarthritis and psoriatic arthritis. Associations with disease activity and diagnostic capacity*. Clin Exp Rheumatol.
- Guggino, G., A. R. Giardina, S. Raimondo, G. Giardina, G. Sireci, F. Dieli, M. Peralta, R. Alessandro, G. Triolo y F. Ciccia (2014). *Targeting IL-6 signalling in early rheumatoid arthritis is followed by Th1 and Th17 suppression and Th2 expansion*. Clin Exp Rheumatol 32(1): 77-81.
- Gutiérrez-Cañas, I., N. Rodríguez-Henche, O. Bolanos, M. J. Carmena, J. C. Prieto y M. G. Juarranz (2003). *VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal*. Br J Pharmacol 139(5): 1050-1058.
- Gutiérrez-Cañas, I., M. G. Juarranz, B. Collado, N. Rodríguez-Henche, A. Chiloeches, J. C. Prieto y M. J. Carmena (2005). *Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K*. Prostate 63(1): 44-55.
- Gutiérrez-Cañas, I., Y. Juarranz, B. Santiago, A. Arranz, C. Martínez, M. Galindo, M. Paya, R. P. Gomariz y J. L. Pablos (2006). *VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts*. Rheumatology (Oxford) 45(5): 527-532.
- Gutiérrez-Cañas, I., Y. Juarranz, B. Santiago, C. Martínez, R. P. Gomariz, J. L. Pablos y J. Leceta (2008). *Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis*. Brain Behav Immun 22(3): 312-317.
- Hagen, B. M., O. Bayguinov y K. M. Sanders (2006). *VIP and PACAP regulate localized Ca²⁺ transients via cAMP-dependent mechanism*. Am J Physiol Cell Physiol 291(2): C375-385.

- Haghjoo, K., P. W. Cash, R. S. Farid, B. R. Komisaruk, F. Jordan y S. S. Pochapsky (1996). *Solution structure of vasoactive intestinal polypeptide (11-28)-NH₂, a fragment with analgesic properties*. Pept Res 9(6): 327-331.
- Hahm, S. H. y L. E. Eiden (1998a). *Cis-regulatory elements controlling basal and inducible VIP gene transcription*. Ann N Y Acad Sci 865: 10-26.
- Hahm, S. H. y L. E. Eiden (1998b). *Five Discrete Cis-active Domains Direct Cell Type-specific Transcription of the Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Gene*. Journal of Biological Chemistry 273(27): 17086-17094.
- Hamelink, C., S. H. Hahm, H. Huang y L. E. Eiden (2004). *A restrictive element 1 (RE-1) in the VIP gene modulates transcription in neuronal and non-neuronal cells in collaboration with an upstream tissue specifier element*. Journal of Neurochemistry 88(5): 1091-1101.
- Hammer, R. E., S. D. Maika, J. A. Richardson, J. P. Tang y J. D. Taurog (1990). *Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders*. Cell 63(5): 1099-1112.
- Harikumar, K. G., M. M. Morfis, C. S. Lisenbee, P. M. Sexton y L. J. Miller (2006). *Constitutive formation of oligomeric complexes between family B G protein-coupled vasoactive intestinal polypeptide and secretin receptors*. Mol Pharmacol 69(1): 363-373.
- Haringman, J. J., D. M. Gerlag, A. H. Zwinderman, T. J. Smeets, M. C. Kraan, D. Baeten, I. B. McInnes, B. Bresnihan y P. P. Tak (2005). *Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis 64(6): 834-838.
- Harmar, A. J. (2003). *An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei*. J Neuroendocrinol 15(4): 335-338.
- Harmar, A. J., J. Fahrenkrug, I. Gozes, M. Laburthe, V. May, J. R. Pisegna, D. Vaudry, H. Vaudry, J. A. Waschek y S. I. Said (2012). *Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1*. Br J Pharmacol 166(1): 4-17.
- Haroon, N., F. W. Tsui, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler y R. D. Inman (2012). *Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) exhibits functionally significant interaction with HLA-B27 and relates to subtype specificity in ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis 71(4): 589-595.
- Haroon, N., R. D. Inman, T. J. Learch, M. H. Weisman, M. Lee, M. H. Rahbar, M. M. Ward, J. D. Reveille y L. S. Gensler (2013). *The impact of tumor necrosis factor alpha inhibitors on radiographic progression in ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum 65(10): 2645-2654.
- Harre, U., D. Georgess, H. Bang, A. Bozec, R. Axmann, E. Ossipova, P. J. Jakobsson, W. Baum, F. Nimmerjahn, E. Szarka, et al. (2012). *Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin*. J Clin Invest 122(5): 1791-1802.
- Harre, U. y G. Schett (2017). *Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis*. Semin Immunopathol.
- Hashimoto, H., T. Ishihara, R. Shigemoto, K. Mori y S. Nagata (1993). *Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. Neuron 11(2): 333-342.
- Hashizume, M., N. Hayakawa y M. Mihara (2008). *IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17*. Rheumatology (Oxford) 47(11): 1635-1640.
- Hauk, V., L. Fraccaroli, E. Grasso, A. Eimon, R. Ramhorst, O. Hubscher y C. Perez Leiros (2014). *Monocytes from Sjogren's syndrome patients display increased vasoactive intestinal peptide receptor 2 expression and impaired apoptotic cell phagocytosis*. Clin Exp Immunol 177(3): 662-670.
- He, T. F., W. J. Yang, S. H. Zhang, C. Y. Zhang, L. B. Li y Y. F. Chen (2011). *Electroacupuncture inhibits inflammation reaction by upregulating vasoactive intestinal Peptide in rats with adjuvant-induced arthritis*. Evid Based Complement Alternat Med 2011.
- Heiberg, T., T. K. Kvien, P. Mowinckel, D. Aletaha, J. S. Smolen y K. B. Hagen (2008). *Identification of disease activity and health status cut-off points for the symptom state acceptable to patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis 67(7): 967-971.
- Heiland, G. R., H. Appel, D. Poddubnyy, J. Zwerina, A. Hueber, H. Haibel, X. Baraliakos, J. Listing, M. Rudwaleit, G. Schett y J. Sieper (2012). *High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis 71(4): 572-574.
- Henning, R. J. y D. R. Sawmiller (2001). *Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects*. Cardiovasc Res 49(1): 27-37.

- Hermann, E., D. T. Yu, K. H. Meyer zum Buschenfelde y B. Fleischer (1993). *HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis*. *Lancet* 342(8872): 646-650.
- Herrero-Beaumont, G., M. J. Martinez Calatrava y S. Castaneda (2012). *Abatacept mechanism of action: concordance with its clinical profile*. *Reumatol Clin* 8(2): 78-83.
- Hill, S. J., C. Williams y L. T. May (2010). *Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies*. *Br J Pharmacol* 161(6): 1266-1275.
- Hirata, S., L. Dirven, Y. Shen, M. Centola, G. Cavet, W. F. Lems, Y. Tanaka, T. W. Huizinga y C. F. Allaart (2013). *A multi-biomarker score measures rheumatoid arthritis disease activity in the BeSt study*. *Rheumatology (Oxford)* 52(7): 1202-1207.
- Hoffmeyer, S., O. Burk, O. von Richter, H. P. Arnold, J. Brockmoller, A. John, I. Cascorbi, T. Gerloff, I. Roots, M. Eichelbaum y U. Brinkmann (2000). *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3473-3478.
- Holers, V. M. (2014). *Insights from populations at risk for the future development of classified rheumatoid arthritis*. *Rheum Dis Clin North Am* 40(4): 605-620.
- Hosoya, M., H. Onda, K. Ogi, Y. Masuda, Y. Miyamoto, T. Ohtaki, H. Okazaki, A. Arimura y M. Fujino (1993). *Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)*. *Biochem Biophys Res Commun* 194(1): 133-143.
- Hreggvidsdottir, H. S., T. Noordenbos y D. L. Baeten (2014). *Inflammatory pathways in spondyloarthritis*. *Mol Immunol* 57(1): 28-37.
- Ishihara, T., R. Shigemoto, K. Mori, K. Takahashi y S. Nagata (1992). *Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide*. *Neuron* 8(4): 811-819.
- Itoh, N., K. Obata, N. Yanaihara y H. Okamoto (1983). *Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27*. *Nature* 304(5926): 547-549.
- Itri, J. y C. S. Colwell (2003). *Regulation of inhibitory synaptic transmission by vasoactive intestinal peptide (VIP) in the mouse suprachiasmatic nucleus*. *J Neurophysiol* 90(3): 1589-1597.
- Ivanova, M., S. Belcheva, I. Belcheva, N. Negrev y R. Tashev (2012). *Lateralized hippocampal effects of vasoactive intestinal peptide on learning and memory in rats in a model of depression*. *Psychopharmacology (Berl)* 221(4): 561-574.
- Jacques, P., S. Lambrecht, E. Verheugen, E. Pauwels, G. Kollias, M. Armaka, M. Verhoye, A. Van der Linden, R. Achten, R. J. Lories y D. Elewaut (2014). *Proof of concept: enthesitis and new bone formation in spondyloarthritis are driven by mechanical strain and stromal cells*. *Ann Rheum Dis* 73(2): 437-445.
- Jankovic, B. D., Markovic, B.M., Spector, N.H. (1987). *Neuroimmune interactions: Proceedings of the Second International Workshop on Neuroimmunomodulation*. *Ann N Y Acad Sci* 496: 1-756.
- Jansen, D. T., M. Hameetman, J. van Bergen, T. W. Huizinga, D. van der Heijde, R. E. Toes y F. A. van Gaalen (2015). *IL-17-producing CD4+ T cells are increased in early, active axial spondyloarthritis including patients without imaging abnormalities*. *Rheumatology (Oxford)* 54(4): 728-735.
- Jiang, S., E. Koprass, M. McMichael, R. H. Bell, Jr. y C. D. Ulrich, 2nd (1997). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates in vitro growth of VIP-1 receptor-bearing human pancreatic adenocarcinoma-derived cells*. *Cancer Res* 57(8): 1475-1480.
- Jiang, W., S. G. Gao, X. G. Chen, X. C. Xu, M. Xu, W. Luo, M. Tu, F. J. Zhang, C. Zeng y G. H. Lei (2012). *Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: a new indicator of disease severity?* *Clin Biochem* 45(18): 1607-1612.
- Jiang, W., H. Wang, Y. S. Li y W. Luo (2016). *Role of vasoactive intestinal peptide in osteoarthritis*. *J Biomed Sci* 23(1): 63.
- Jimeno, R., R. P. Gomariz, I. Gutiérrez-Cañas, C. Martínez, Y. Juarranz y J. Leceta (2010). *New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes*. *Immunol Cell Biol* 88(7): 734-745.
- Jimeno, R., J. Leceta, C. Martínez, I. Gutiérrez-Cañas, M. Carrión, S. Pérez-García, M. Garín, M. Mellado, R. P. Gomariz y Y. Juarranz (2014). *Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells*. *J Mol Neurosci* 54(3): 512-525.
- Jimeno, R., R. P. Gomariz, M. Garin, I. Gutiérrez-Cañas, I. González-Álvaro, M. Carrión, M. Galindo, J. Leceta y Y. Juarranz (2015a). *The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP*. *J Mol Med (Berl)* 93(4): 457-467.
- Jimeno, R., J. Leceta, M. Garin, A. M. Ortiz, M. Mellado, J. M. Rodríguez-Frade, C. Martínez, S.

- Perez-Garcia, R. P. Gomariz y Y. Juarranz (2015b). *Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect*. J Leukoc Biol 98(2): 257-269.
- Jimeno, R., J. Leceta, M. Garín, A. M. Ortiz, M. Mellado, J. M. Rodríguez-Frade, C. Martínez, S. Pérez-García, R. P. Gomariz y Y. Juarranz (2015c). *Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect*. J Leukoc Biol 98(2): 257-269.
- Joensuu, J. T., S. Huoponen, K. J. Aaltonen, Y. T. Konttinen, D. Nordstrom y M. Blom (2015). *The cost-effectiveness of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review*. PLoS One 10(3): e0119683.
- Johansson, O. y J. M. Lundberg (1981). *Ultrastructural localization of VIP-like immunoreactivity in large dense-core vesicles of 'cholinergic-type' nerve terminals in cat exocrine glands*. Neuroscience 6(5): 847-862.
- Johnston, C. A. y D. P. Siderovski (2007). *Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights*. Mol Pharmacol 72(2): 219-230.
- Jose, P. J., I. K. Moss, R. N. Maini y T. J. Williams (1990). *Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase*. Ann Rheum Dis 49(10): 747-752.
- Juarez, M., H. Bang, F. Hammar, U. Reimer, B. Dyke, I. Sahbudin, C. D. Buckley, B. Fisher, A. Filer y K. Raza (2016). *Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis*. Ann Rheum Dis 75(6): 1099-1107.
- Juarranz, M. G., J. Van Rampelbergh, P. Gourlet, P. De Neef, J. Cnudde, P. Robberecht y M. Waelbroeck (1999). *Vasoactive intestinal polypeptide VPAC1 and VPAC2 receptor chimeras identify domains responsible for the specificity of ligand binding and activation*. Eur J Biochem 265(1): 449-456.
- Juarranz, M. G., G. Bodega, J. C. Prieto y L. G. Guijarro (2001). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates rat prostatic epithelial cell proliferation*. Prostate 47(4): 285-292.
- Juarranz, M. G., B. Santiago, M. Torroba, I. Gutiérrez-Cañas, G. Palao, M. Galindo, C. Abad, C. Martínez, J. Leceta, J. L. Pablos y R. P. Gomariz (2004). *Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells*. Rheumatology (Oxford) 43(4): 416-422.
- Juarranz, Y., I. Gutiérrez-Cañas, A. Arranz, C. Martínez, C. Abad, J. Leceta, J. L. Pablos y R. P. Gomariz (2006). *VIP decreases TLR4 expression induced by LPS and TNF-alpha treatment in human synovial fibroblasts*. Ann N Y Acad Sci 1070: 359-364.
- Juarranz, Y., I. Gutiérrez-Cañas, B. Santiago, M. Carrión, J. L. Pablos y R. P. Gomariz (2008). *Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum 58(4): 1086-1095.
- Juhasz, T., S. L. Helgadottir, A. Tamas, D. Reglodi y R. Zakany (2015). *PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis*. Peptides 66: 51-57.
- Julia, A., A. Fernandez-Nebro, F. Blanco, A. Ortiz, J. D. Canete, J. Maymo, M. Alperi-Lopez, B. Fernandez-Gutierrez, A. Olive, H. Corominas, et al. (2016). *A genome-wide association study identifies a new locus associated with the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis*. Pharmacogenomics J 16(2): 147-150.
- Kallberg, H., B. Ding, L. Padyukov, C. Bengtsson, J. Ronnelid, L. Klareskog, L. Alfredsson y E. S. Group (2011). *Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke*. Ann Rheum Dis 70(3): 508-511.
- Kalliolias, G. D. y L. B. Ivashkiv (2016). *TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies*. Nat Rev Rheumatol 12(1): 49-62.
- Kanaseki, T., N. Blanchard, G. E. Hammer, F. Gonzalez y N. Shastri (2006). *ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum*. Immunity 25(5): 795-806.
- Keith, M. P., J. D. Edison y W. R. Gilliland (2012). *Progress toward personalized treatment of rheumatoid arthritis*. Clin Pharmacol Ther 92(4): 440-442.
- Kenna, T. J., S. I. Davidson, R. Duan, L. A. Bradbury, J. McFarlane, M. Smith, H. Weedon, S. Street, R. Thomas, G. P. Thomas y M. A. Brown (2012). *Enrichment of circulating interleukin-17-secreting interleukin-23 receptor-positive gamma/delta T cells in patients with active ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum 64(5): 1420-1429.
- Khandpur, R., C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri, A. Gizinski, S. Yalavarthi, J. S. Knight, S. Friday, S. Li, R. M. Patel, V. Subramanian, et al. (2013). *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis*. Sci Transl Med 5(178): 178ra140.

- Kilani, R. T., W. P. Maksymowych, A. Aitken, G. Boire, Y. St-Pierre, Y. Li y A. Ghahary (2007). *Detection of high levels of 2 specific isoforms of 14-3-3 proteins in synovial fluid from patients with joint inflammation*. J Rheumatol 34(8): 1650-1657.
- Kiltz, U., X. Baraliakos, P. Karakostas, M. Igelmann, L. Kalthoff, C. Klink, D. Krause, E. Schmitz-Bortz, M. Florecke, M. Bollow y J. Braun (2012). *The degree of spinal inflammation is similar in patients with axial spondyloarthritis who report high or low levels of disease activity: a cohort study*. Ann Rheum Dis 71(7): 1207-1211.
- Kim, V. N. y J. W. Nam (2006). *Genomics of microRNA*. Trends Genet 22(3): 165-173.
- Kirwan, J. R., S. E. Hewlett, T. Heiberg, R. A. Hughes, M. Carr, M. Hehir, T. K. Kvien, P. Minnock, S. P. Newman, E. M. Quest, E. Taal y J. Wale (2005). *Incorporating the patient perspective into outcome assessment in rheumatoid arthritis--progress at OMERACT 7*. J Rheumatol 32(11): 2250-2256.
- Klarenbeek, N. B., S. M. van der Kooij, M. Guler-Yuksel, J. H. van Groenendael, K. H. Han, P. J. Kerstens, T. W. Huizinga, B. A. Dijkmans y C. F. Allaart (2011). *Discontinuing treatment in patients with rheumatoid arthritis in sustained clinical remission: exploratory analyses from the BeSt study*. Ann Rheum Dis 70(2): 315-319.
- Klein, K. y S. Gay (2015). *Epigenetics in rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol 27(1): 76-82.
- Klingberg, E., M. Nurkkala, H. Carlsten y H. Forsblad-d'Elia (2014). *Biomarkers of bone metabolism in ankylosing spondylitis in relation to osteoproliferation and osteoporosis*. J Rheumatol 41(7): 1349-1356.
- Klippstein, R. y D. Pozo (2015). *Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Nanoparticles for Diagnostics and for Controlled and Targeted Drug Delivery*. Adv Protein Chem Struct Biol 98: 145-168.
- Koenders, M. I., E. Lubberts, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, M. M. Helsen, F. E. Di Padova, A. M. Boots, H. Gram, L. A. Joosten y W. B. van den Berg (2005). *Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1*. Am J Pathol 167(1): 141-149.
- Koh, S. W. y J. A. Waschek (2000). *Corneal endothelial cell survival in organ cultures under acute oxidative stress: effect of VIP*. Invest Ophthalmol Vis Sci 41(13): 4085-4092.
- Koh, S. W. (2012). *Corneal endothelial autocrine trophic factor VIP in a mechanism-based strategy to enhance human donor cornea preservation for transplantation*. Exp Eye Res 95(1): 48-53.
- Kojima, M., T. Ito, T. Oono, T. Hisano, H. Igarashi, Y. Arita, K. Kawabe, D. H. Coy, R. T. Jensen y H. Nawata (2005). *VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production*. Pancreas 30(1): 62-70.
- Koopman, F. A., S. P. Stoof, R. H. Straub, M. A. Van Maanen, M. J. Vervoordeldonk y P. P. Tak (2011). *Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis*. Mol Med 17(9-10): 937-948.
- Korkmaz, O. T., N. Tuncel, M. Tuncel, E. M. Oncu, V. Sahinturk y M. Celik (2010). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment of Parkinsonian rats increases thalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) levels and alters the release of nerve growth factor (NGF) by mast cells*. J Mol Neurosci 41(2): 278-287.
- Krishnamurthy, A., V. Joshua, A. Haj Hensvold, T. Jin, M. Sun, N. Vivar, A. J. Ytterberg, M. Engstrom, C. Fernandes-Cerqueira, K. Amara, et al. (2016). *Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss*. Ann Rheum Dis 75(4): 721-729.
- Kroon, F., R. Landewe, M. Dougados y D. van der Heijde (2012). *Continuous NSAID use reverts the effects of inflammation on radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis 71(10): 1623-1629.
- Kurowska-Stolarska, M., S. Alivernini, L. E. Ballantine, D. L. Asquith, N. L. Millar, D. S. Gilchrist, J. Reilly, M. Ierna, A. R. Fraser, B. Stolarski, et al. (2011). *MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A 108(27): 11193-11198.
- Laburthe, M., M. Rousset, C. Boissard, G. Chevalier, A. Zweibaum y G. Rosselin (1978). *Vasoactive intestinal peptide: a potent stimulator of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture*. Proc Natl Acad Sci U S A 75(6): 2772-2775.
- Laburthe, M. y A. Couvineau (2002). *Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP*. Regul Pept 108(2-3): 165-173.
- Laburthe, M., A. Couvineau y J. C. Marie (2002). *VPAC receptors for VIP and PACAP*. Receptors Channels 8(3-4): 137-153.
- Laburthe, M., A. Couvineau y V. Tan (2007). *Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology*. Peptides 28(9): 1631-1639.

- Lamana, A., A. Balsa, B. Rueda, A. M. Ortiz, L. Nuno, M. E. Miranda-Carús, M. F. González-Escribano, M. A. López-Nevot, D. Pascual-Salcedo, J. Martín y I. González-Álvarez (2012). *The TT genotype of the STAT4 rs7574865 polymorphism is associated with high disease activity and disability in patients with early arthritis*. PLoS One 7(8): e43661.
- Landewe, R., M. Dougados, H. Mielants, H. van der Tempel y D. van der Heijde (2009). *Physical function in ankylosing spondylitis is independently determined by both disease activity and radiographic damage of the spine*. Ann Rheum Dis 68(6): 863-867.
- Langer, I. (2012). *Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies*. Front Endocrinol (Lausanne) 3: 129.
- Lara-Marquez, M., M. O'Dorisio, T. O'Dorisio, M. Shah y B. Karacay (2001). *Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells*. J Immunol 166(4): 2522-2530.
- Lauenstein, H. D., D. Quarcoo, L. Plappert, C. Schleh, M. Nassimi, C. Pilzner, S. Rochlitzer, P. Brabet, T. Welte, H. G. Hoymann, et al. (2011). *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 mediates anti-inflammatory effects in allergic airway inflammation in mice*. Clin Exp Allergy 41(4): 592-601.
- Law, S. C., S. Street, C. H. Yu, C. Capini, S. Ramnorruth, H. J. Nel, E. van Gorp, C. Hyde, K. Lau, H. Pahau, A. W. Purcell y R. Thomas (2012). *T-cell autoreactivity to citrullinated autoantigenic peptides in rheumatoid arthritis patients carrying HLA-DRB1 shared epitope alleles*. Arthritis Res Ther 14(3): R118.
- Layh-Schmitt, G. y R. A. Colbert (2008). *The interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis*. Curr Opin Rheumatol 20(4): 392-397.
- Layh-Schmitt, G., E. Y. Yang, G. Kwon y R. A. Colbert (2013). *HLA-B27 alters the response to tumor necrosis factor alpha and promotes osteoclastogenesis in bone marrow monocytes from HLA-B27-transgenic rats*. Arthritis Rheum 65(8): 2123-2131.
- Le Pechon-Vallee, C., K. Magalon, R. Rasolonjanahary, A. Enjalbert y C. Gerard (2000). *Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides stimulate mitogen-activated protein kinase in the pituitary cell line GH4C1 by a 3',5'-cyclic adenosine monophosphate pathway*. Neuroendocrinology 72(1): 46-56.
- Lea, W. I. y Y. H. Lee (2012). *The associations between interleukin-1 polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis: a meta-analysis*. Joint Bone Spine 79(4): 370-374.
- Leceta, J., M. C. Martinez, M. Delgado, E. Garrido y R. P. Gomariz (1994). *Lymphoid cell subpopulations containing vasoactive intestinal peptide in the rat*. Peptides 15(5): 791-797.
- Leceta, J., R. P. Gomariz, C. Martínez, M. Carrión, A. Arranz y Y. Juarranz (2007). *Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. Neuroimmunomodulation 14(3-4): 134-138.
- Lee, J. C., M. Espeli, C. A. Anderson, M. A. Linterman, J. M. Pocock, N. J. Williams, R. Roberts, S. Viatte, B. Fu, N. Peshu, et al. (2013). *Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway*. Cell 155(1): 57-69.
- Lee, Y. H., S. C. Bae y G. G. Song (2014). *Functional FCGR3A 158 V/F and IL-6 -174 C/G polymorphisms predict response to biologic therapy in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Rheumatol Int 34(10): 1409-1415.
- Lerner, U. H. y E. Persson (2008). *Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide*. J Musculoskelet Neuronal Interact 8(2): 154-165.
- Leuchte, H. H., C. Baezner, R. A. Baumgartner, D. Bevec, G. Bacher, C. Neurohr y J. Behr (2008). *Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension*. Eur Respir J 32(5): 1289-1294.
- Li, G. H., W. Qian, G. Q. Song y X. H. Hou (2007). *Effect of vasoactive intestinal peptide on gastric adenocarcinoma*. J Gastroenterol Hepatol 22(8): 1328-1335.
- Li, H., Y. Mei, Y. Wang y L. Xu (2006). *Vasoactive intestinal polypeptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses*. J Clin Immunol 26(5): 430-437.
- Liao, K. P., L. Alfredsson y E. W. Karlson (2009). *Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis*. Curr Opin Rheumatol 21(3): 279-283.
- Lin, P., M. Bach, M. Asquith, A. Y. Lee, L. Akileswaran, P. Stauffer, S. Davin, Y. Pan, E. D. Cambonne, M. Dorris, et al. (2014). *HLA-B27 and human beta2-microglobulin affect the gut microbiota of transgenic rats*. PLoS One 9(8): e105684.
- Lisignoli, G., S. Toneguzzi, A. Piacentini, L. Cattini, A. Lenti, M. Tschon, S. Cristino, F. Grassi y A. Facchini (2003). *Human osteoblasts express functional CXCR chemokine receptors 3 and 5: activation by their*

- ligands, CXCL10 and CXCL13, significantly induces alkaline phosphatase and beta-N-acetylhexosaminidase release. *J Cell Physiol* 194(1): 71-79.
- Liu, D., K. Krajniak, D. Chun, M. Sena, R. Casillas, V. Lelievre, T. Nguyen, D. Bravo, S. Colburn y J. A. Waschek (2001). *VIP gene transcription is regulated by far upstream enhancer and repressor elements*. *Biochem Biophys Res Commun* 284(1): 211-218.
- Liu, X., B. Zeng, J. Zhang, W. Li, F. Mou, H. Wang, Q. Zou, B. Zhong, L. Wu, H. Wei y Y. Fang (2016). *Role of the Gut Microbiome in Modulating Arthritis Progression in Mice*. *Sci Rep* 6: 30594.
- Liu, Y., M. J. Aryee, L. Padyukov, M. D. Fallin, E. Hesselberg, A. Runarsson, L. Reinius, N. Acevedo, M. Taub, M. Ronninger, et al. (2013). *Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis*. *Nat Biotechnol* 31(2): 142-147.
- Lodde, B. M., C. Delporte, C. M. Goldsmith, P. P. Tak y B. J. Baum (2004). *A recombinant adenoviral vector encoding functional vasoactive intestinal peptide*. *Biochem Biophys Res Commun* 319(1): 189-192.
- Lodde, B. M., F. Mineshiba, J. Wang, A. P. Cotrim, S. Afione, P. P. Tak y B. J. Baum (2006). *Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome*. *Ann Rheum Dis* 65(2): 195-200.
- Lories, R. J., I. Derese y F. P. Luyten (2005). *Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis*. *J Clin Invest* 115(6): 1571-1579.
- Lories, R. J., I. Derese, C. de Bari y F. P. Luyten (2007). *Evidence for uncoupling of inflammation and joint remodeling in a mouse model of spondylarthritis*. *Arthritis Rheum* 56(2): 489-497.
- Lories, R. J., I. Derese y F. P. Luyten (2008). *Inhibition of osteoclasts does not prevent joint ankylosis in a mouse model of spondylarthritis*. *Rheumatology (Oxford)* 47(5): 605-608.
- Lories, R. J., F. P. Luyten y K. de Vlam (2009). *Progress in spondylarthritis. Mechanisms of new bone formation in spondylarthritis*. *Arthritis Res Ther* 11(2): 221.
- Lories, R. J. y N. Haroon (2014). *Bone formation in axial spondylarthritis*. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28(5): 765-777.
- Lubbers, J., M. Brink, L. A. van de Stadt, S. Vosslander, J. G. Wesseling, D. van Schaardenburg, S. Rantapaa-Dahlqvist y C. L. Verweij (2013). *The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis* 72(5): 776-780.
- Lubbers, J., S. Vosslander, L. A. van de Stadt, M. van Beers-Tas, J. G. Wesseling, B. M. von Blomberg, B. I. Witte, H. J. Bontkes, D. van Schaardenburg y C. L. Verweij (2015). *B cell signature contributes to the prediction of RA development in patients with arthralgia*. *Ann Rheum Dis* 74(9): 1786-1788.
- Lubberts, E. (2015). *The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis*. *Nat Rev Rheumatol* 11(10): 562.
- Luime, J. J., E. M. Colin, J. M. Hazes y E. Lubberts (2010). *Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis? A systematic review*. *Ann Rheum Dis* 69(2): 337-344.
- Lukas, C., R. Landewe, J. Sieper, M. Dougados, J. Davis, J. Braun, S. van der Linden, D. van der Heijde y S. Assessment of SpondyloArthritis international (2009). *Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis*. *Ann Rheum Dis* 68(1): 18-24.
- Lundberg, P., I. Bostrom, H. Mukohyama, A. Bjurholm, K. Smans y U. H. Lerner (1999). *Neuro-hormonal control of bone metabolism: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules*. *Regul Pept* 85(1): 47-58.
- Lundberg, P., A. Lie, A. Bjurholm, P. P. Lehenkari, M. A. Horton, U. H. Lerner y M. Ransjo (2000). *Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts*. *Bone* 27(6): 803-810.
- Lutz, E. M., W. J. Sheward, K. M. West, J. A. Morrow, G. Fink y A. J. Harmar (1993). *The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide*. *FEBS Lett* 334(1): 3-8.
- Machado, P., R. Landewe, J. Braun, K. G. Hermann, D. Baker y D. van der Heijde (2010). *Both structural damage and inflammation of the spine contribute to impairment of spinal mobility in patients with ankylosing spondylitis*. *Ann Rheum Dis* 69(8): 1465-1470.
- Machado, P., R. B. Landewe, J. Braun, X. Baraliakos, K. G. Hermann, B. Hsu, D. Baker y D. van der Heijde (2012). *MRI inflammation and its relation with measures of clinical disease activity and different treatment responses in patients with ankylosing spondylitis treated with a tumour necrosis factor inhibitor*. *Ann Rheum Dis* 71(12): 2002-2005.

- Madsen, B., B. Georg, M. W. Madsen y J. Fahrenkrug (2001). *Estradiol down regulates expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor type-1 in breast cancer cell lines*. Mol Cell Endocrinol 172(1-2): 203-211.
- Madsen, K. B. y A. G. Jurik (2010). *Magnetic resonance imaging grading system for active and chronic spondylarthritis changes in the sacroiliac joint*. Arthritis Care Res (Hoboken) 62(1): 11-18.
- Maduna, T. y V. Lelievre (2016). *Neuropeptides shaping the central nervous system development: Spatiotemporal actions of VIP and PACAP through complementary signaling pathways*. J Neurosci Res 94(12): 1472-1487.
- Mahavadi, S., S. Bhattacharya, J. Kim, S. Fayed, O. Al-Shboul, J. R. Grider y K. S. Murthy (2013). *Caveolae-dependent internalization and homologous desensitization of VIP/PACAP receptor, VPAC(2), in gastrointestinal smooth muscle*. Peptides 43: 137-145.
- Maksymowych, W. P., R. Landewe, B. Conner-Spady, M. Dougados, H. Mielants, H. van der Tempel, A. R. Poole, N. Wang y D. van der Heijde (2007). *Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis*. Arthritis Rheum 56(6): 1846-1853.
- Maksymowych, W. P., P. Rahman, K. Shojania, W. P. Olszynski, G. T. Thomson, S. Ballal, R. L. Wong, R. D. Inman y M. S. Group (2008). *Beneficial effects of adalimumab on biomarkers reflecting structural damage in patients with ankylosing spondylitis*. J Rheumatol 35(10): 2030-2037.
- Maksymowych, W. P., P. Chiowchanwisawakit, T. Clare, S. J. Pedersen, M. Ostergaard y R. G. Lambert (2009). *Inflammatory lesions of the spine on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis: evidence of a relationship between inflammation and new bone formation*. Arthritis Rheum 60(1): 93-102.
- Maksymowych, W. P. (2013). *Spondyloarthritis. Treat-to-target in spondyloarthritis--do we have a plan?* Nat Rev Rheumatol 9(9): 507-508.
- Maksymowych, W. P., N. Morency, B. Conner-Spady y R. G. Lambert (2013). *Suppression of inflammation and effects on new bone formation in ankylosing spondylitis: evidence for a window of opportunity in disease modification*. Ann Rheum Dis 72(1): 23-28.
- Maksymowych, W. P. y A. Marotta (2014). *14-3-3eta: a novel biomarker platform for rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol 32(5 Suppl 85): S-35-39.
- Maksymowych, W. P., S. J. Naides, V. Bykerk, K. A. Siminovitch, D. van Schaardenburg, M. Boers, R. Landewe, D. van der Heijde, P. P. Tak, M. C. Genovese, et al. (2014a). *Serum 14-3-3eta is a novel marker that complements current serological measurements to enhance detection of patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol 41(11): 2104-2113.
- Maksymowych, W. P., D. van der Heijde, C. F. Allaart, R. Landewe, G. Boire, P. P. Tak, Y. Gui, A. Ghahary, R. Kilani y A. Marotta (2014b). *14-3-3eta is a novel mediator associated with the pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint damage*. Arthritis Res Ther 16(2): R99.
- Maksymowych, W. P. (2015). *Biomarkers in axial spondyloarthritis*. Curr Opin Rheumatol 27(4): 343-348.
- Maksymowych, W. P., G. Boire, D. van Schaardenburg, S. Wichuk, S. Turk, M. Boers, K. A. Siminovitch, V. Bykerk, E. Keystone, P. P. Tak, et al. (2015). *14-3-3eta Autoantibodies: Diagnostic Use in Early Rheumatoid Arthritis*. J Rheumatol 42(9): 1587-1594.
- Malhotra, R. K., T. D. Wakade y A. R. Wakade (1988). *Vasoactive intestinal polypeptide and muscarine mobilize intracellular Ca²⁺ through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion. Role of IP₃ in exocytosis*. J Biol Chem 263(5): 2123-2126.
- Mankia, K. y P. Emery (2016a). *Preclinical Rheumatoid Arthritis: Progress Toward Prevention*. Arthritis Rheumatol 68(4): 779-788.
- Mankia, K. y P. Emery (2016b). *A new window of opportunity in rheumatoid arthritis: targeting at-risk individuals*. Curr Opin Rheumatol 28(3): 260-266.
- Mannik, M. (1992). *Rheumatoid factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J Rheumatol Suppl 32: 46-49.
- Markusse, I. M., L. Dirven, M. van den Broek, C. Bijkerk, K. H. Han, H. K. Runday, R. Bolce, E. H. Sasso, P. J. Kerstens, W. F. Lems, T. W. Huizinga y C. F. Allaart (2014). *A multibiomarker disease activity score for rheumatoid arthritis predicts radiographic joint damage in the BeSt study*. J Rheumatol 41(11): 2114-2119.
- Marotta A., M. W. P. (2014). *Levels of 14-3-3Eta Predict Good Eular Response to Anti-TNF Treatment in Patients with Rheumatoid Arthritis*. Ann Rheum Dis 73(Suppl. 2): 615-616.
- Martínez, C., M. Delgado, C. Abad, R. P. Gomariz, D. Ganea y J. Leceta (1999). *Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes*. J Neuroimmunol 93(1-2): 126-138.

- Martínez, C., C. Abad, M. Delgado, A. Arranz, M. G. Juarranz, N. Rodríguez-Henche, P. Brabet, J. Leceta y R. P. Gomariz (2002). *Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A 99(2): 1053-1058.
- Masaka, T., Y. Li, S. Kawatobi, Y. Koide, A. Takami, K. Yano, R. Imai, N. Yagi, H. Suzuki, H. Hikawa, I. Tatsuno, K. Terada y Y. Yokoyama (2014). *[Liposome modified with VIP-lipopeptide as a new drug delivery system]*. Yakugaku Zasshi 134(9): 987-995.
- Masmoudi-Kouki, O., P. Gandolfo, H. Castel, J. Leprince, A. Fournier, A. Dejda, H. Vaudry y M. C. Tonon (2007). *Role of PACAP and VIP in astroglial functions*. Peptides 28(9): 1753-1760.
- May, E., M. L. Dorris, N. Satumtira, I. Iqbal, M. I. Rehman, E. Lightfoot y J. D. Taurog (2003). *CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats*. J Immunol 170(2): 1099-1105.
- McCarty, D. J. (1990). *Suppress rheumatoid inflammation early and leave the pyramid to the Egyptians*. J Rheumatol 17(9): 1115-1118.
- McCulloch, D. A., E. M. Lutz, M. S. Johnson, C. J. MacKenzie y R. Mitchell (2000). *Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors*. Ann N Y Acad Sci 921: 175-185.
- McInnes, I. B. y G. Schett (2007). *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol 7(6): 429-442.
- McInnes, I. B. y G. Schett (2011). *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. N Engl J Med 365(23): 2205-2219.
- McInnes, I. B., C. D. Buckley y J. D. Isaacs (2016). *Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape*. Nat Rev Rheumatol 12(1): 63-68.
- Mear, J. P., K. L. Schreiber, C. Munz, X. Zhu, S. Stevanovic, H. G. Rammensee, S. L. Rowland-Jones y R. A. Colbert (1999). *Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies*. J Immunol 163(12): 6665-6670.
- Medina, M. W., F. Gao, W. Ruan, J. I. Rotter y R. M. Krauss (2008). *Alternative splicing of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase is associated with plasma low-density lipoprotein cholesterol response to simvastatin*. Circulation 118(4): 355-362.
- Meednu, N., H. Zhang, T. Owen, W. Sun, V. Wang, C. Cistrone, J. Rangel-Moreno, L. Xing y J. H. Anolik (2016). *Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Rheumatol 68(4): 805-816.
- Mei, Y., F. Pan, J. Gao, R. Ge, Z. Duan, Z. Zeng, F. Liao, G. Xia, S. Wang, S. Xu, J. Xu, L. Zhang y D. Ye (2011). *Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis*. Clin Rheumatol 30(2): 269-273.
- Metwali, A., A. M. Blum, J. Li, D. E. Elliott y J. V. Weinstock (2000). *IL-4 regulates VIP receptor subtype 2 mRNA (VPAC2) expression in T cells in murine schistosomiasis*. FASEB J 14(7): 948-954.
- Michaud, K., V. Strand, N. A. Shadick, I. Degtiar, K. Ford, S. N. Michalopoulos y J. Hornberger (2015). *Outcomes and costs of incorporating a multibiomarker disease activity test in the management of patients with rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford) 54(9): 1640-1649.
- Mikuls, T. R., J. B. Payne, F. Yu, G. M. Thiele, R. J. Reynolds, G. W. Cannon, J. Markt, D. McGowan, G. S. Kerr, R. S. Redman, et al. (2014). *Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheumatol 66(5): 1090-1100.
- Miossec, P. y J. K. Kolls (2012). *Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation*. Nat Rev Drug Discov 11(10): 763-776.
- Miyata, A., A. Arimura, R. R. Dahl, N. Minamino, A. Uehara, L. Jiang, M. D. Culler y D. H. Coy (1989). *Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells*. Biochem Biophys Res Commun 164(1): 567-574.
- Mohan, C. y S. Assassi (2015). *Biomarkers in rheumatic diseases: how can they facilitate diagnosis and assessment of disease activity?* BMJ 351: h5079.
- Moll, J. M., I. Haslock, I. F. Macrae y V. Wright (1974). *Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behcet's syndrome*. Medicine (Baltimore) 53(5): 343-364.
- Moll, J. M. (1983). *Seronegative arthropathies*. J R Soc Med 76(6): 445-448.
- Montacer Kchir, M., M. Mehdi Ghannouchi, W. Hamdi, D. Azzouz, S. Kochbati, K. Saadellaoui, L. Daoud, A. B. Hamida y M. B. Zouari (2009). *Impact of the ankylosing spondylitis on the professional activity*. Joint Bone Spine 76(4): 378-382.
- Moody, T. W., F. Zia, M. Draoui, D. E. Brenneman, M. Fridkin, A. Davidson y I. Gozes (1993). *A vasoactive intestinal peptide antagonist inhibits non-small cell lung cancer growth*. Proc Natl Acad Sci U S A 90(10): 4345-4349.

- Moody, T. W., J. M. Hill y R. T. Jensen (2003). *VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells*. *Peptides* 24(1): 163-177.
- Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros y N. Perrimon (2002). *The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin*. *Science* 296(5573): 1644-1646.
- Moore, C. A., S. K. Milano y J. L. Benovic (2007). *Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins*. *Annu Rev Physiol* 69: 451-482.
- Morice, A., R. J. Unwin y P. S. Sever (1983). *Vasoactive intestinal peptide causes bronchodilatation and protects against histamine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects*. *Lancet* 2(8361): 1225-1227.
- Morini, E., B. Rizzacasa, S. Pucci, C. Polidoro, F. Ferre, D. Caporossi, M. Helmer Citterich, G. Novelli y F. Amati (2016). *The human rs1050286 polymorphism alters LOX-1 expression through modifying miR-24 binding*. *J Cell Mol Med* 20(1): 181-187.
- Morvan, F., K. Boulukos, P. Clement-Lacroix, S. Roman Roman, I. Suc-Royer, B. Vayssiere, P. Ammann, P. Martin, S. Pinho, P. Pognonec, P. Mollat, C. Niehrs, R. Baron y G. Rawadi (2006). *Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass*. *J Bone Miner Res* 21(6): 934-945.
- Muller-Ladner, U., J. Kriegsmann, B. N. Franklin, S. Matsumoto, T. Geiler, R. E. Gay y S. Gay (1996). *Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice*. *Am J Pathol* 149(5): 1607-1615.
- Mustila, A., M. Korpela, A. M. Haapala, H. Kautiainen, L. Laasonen, T. Mottonen, M. Leirisalo-Repo, J. Ilonen, S. Jarvenpaa, R. Luukkainen y P. Hannonen (2011). *Anti-citrullinated peptide antibodies and the progression of radiographic joint erosions in patients with early rheumatoid arthritis treated with FIN-RACo combination and single disease-modifying antirheumatic drug strategies*. *Clin Exp Rheumatol* 29(3): 500-505.
- Nakano, K., D. L. Boyle y G. S. Firestein (2013). *Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes*. *J Immunol* 190(3): 1297-1303.
- Nalbant, S., E. Cagiltay, B. Sahan, H. M. Terekci y C. Oktenli (2011). *The vasoactive intestinal polypeptide (VIP) levels at the patients with ankylosing spondylitis and its association with inflammation markers*. *Rheumatol Int* 31(9): 1143-1146.
- Nam, J. L., S. Ramiro, C. Gaujoux-Viala, K. Takase, M. Leon-Garcia, P. Emery, L. Gossec, R. Landewe, J. S. Smolen y M. H. Buch (2014a). *Efficacy of biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis* 73(3): 516-528.
- Nam, J. L., E. Villeneuve, E. M. Hensor, P. G. Conaghan, H. I. Keen, M. H. Buch, A. K. Gough, M. J. Green, P. S. Helliwell, A. M. Keenan, et al. (2014b). *Remission induction comparing infliximab and high-dose intravenous steroid, followed by treat-to-target: a double-blind, randomised, controlled trial in new-onset, treatment-naive, rheumatoid arthritis (the IDEA study)*. *Ann Rheum Dis* 73(1): 75-85.
- Nell, V. P., K. P. Machold, G. Eberl, T. A. Stamm, M. Uffmann y J. S. Smolen (2004). *Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)* 43(7): 906-914.
- Neumann, J. M., A. Couvineau, S. Murail, J. J. Lacapere, N. Jamin y M. Laburthe (2008). *Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key?* *Trends Biochem Sci* 33(7): 314-319.
- Ni, M., W. Wei, Y. Wang, N. Zhang, H. Ding, C. Shen y F. Zheng (2013). *Serum levels of calreticulin in correlation with disease activity in patients with rheumatoid arthritis*. *J Clin Immunol* 33(5): 947-953.
- Nicole, P., K. Du, A. Couvineau y M. Laburthe (1998). *Site-directed mutagenesis of human vasoactive intestinal peptide receptor subtypes VIP1 and VIP2: evidence for difference in the structure-function relationship*. *J Pharmacol Exp Ther* 284(2): 744-750.
- Nicole, P., L. Lins, C. Rouyer-Fessard, C. Drouot, P. Fulcrand, A. Thomas, A. Couvineau, J. Martinez, R. Brasseur y M. Laburthe (2000a). *Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide*. *J Biol Chem* 275(31): 24003-24012.
- Nicole, P., C. Rouyer-Fessard, A. Couvineau, C. Drouot, P. Fulcrand, J. Martinez y M. Laburthe (2000b). *Alanine scanning of VIP. Structure-function relationship for binding to human recombinant VPAC1 receptor*. *Ann NY Acad Sci* 921: 352-356.
- Nielsen, S. F., S. E. Bojesen, P. Schnohr y B. G. Nordestgaard (2012). *Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study*. *BMJ* 345: e5244.

- NIH-FDA (1998). *NIH-FDA Conference: Biomarkers and Surrogate Endpoints: Advancing Clinical Research and Applications. Abstracts*. Dis Markers 14(4): 187-334.
- Nishimoto, N. y T. Kishimoto (2006). *Interleukin 6: from bench to bedside*. Nat Clin Pract Rheumatol 2(11): 619-626.
- Nishimura, K., D. Sugiyama, Y. Kogata, G. Tsuji, T. Nakazawa, S. Kawano, K. Saigo, A. Morinobu, M. Koshihara, K. M. Kuntz, I. Kamae y S. Kumagai (2007). *Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis*. Ann Intern Med 146(11): 797-808.
- O'Dorisio, M. S., T. M. O'Dorisio, S. Cataland y S. P. Balcerzak (1980). *Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes*. J Lab Clin Med 96(4): 666-672.
- O'Shea, J. J., D. M. Schwartz, A. V. Villarino, M. Gadina, I. B. McInnes y A. Laurence (2015). *The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention*. Annu Rev Med 66: 311-328.
- Ogi, K., Y. Miyamoto, Y. Masuda, Y. Habata, M. Hosoya, T. Ohtaki, Y. Masuo, H. Onda y M. Fujino (1993). *Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor*. Biochem Biophys Res Commun 196(3): 1511-1521.
- Oliva, D., S. Nicosia, A. Spada y G. Giannattasio (1982). *VIP stimulates ACTH release and adenylate cyclase in human ACTH-secreting pituitary adenomas*. Eur J Pharmacol 83(1-2): 101-105.
- Olson, K. E., L. M. Kosloski-Bilek, K. M. Anderson, B. J. Diggs, B. E. Clark, J. M. Gledhill, Jr., S. J. Shandler, R. L. Mosley y H. E. Gendelman (2015). *Selective VIP Receptor Agonists Facilitate Immune Transformation for Dopaminergic Neuroprotection in MPTP-Intoxicated Mice*. J Neurosci 35(50): 16463-16478.
- Olsson, C. y S. Holmgren (2001). *The control of gut motility*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 128(3): 481-503.
- Onyuksel, H., P. S. Mohanty y I. Rubinstein (2009). *VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: a novel targeted nanomedicine for breast cancer*. Int J Pharm 365(1-2): 157-161.
- Ota, M., M. Yanagisawa, H. Tachibana, K. Yokota, Y. Araki, K. Sato y T. Mimura (2015). *A significant induction of neutrophilic chemoattractants but not RANKL in synoviocytes stimulated with interleukin 17*. J Bone Miner Metab 33(1): 40-47.
- Ottesen, B. y J. Fahrenkrug (1995). *Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance*. Am J Obstet Gynecol 172(5): 1615-1631.
- Pablos Alvarez, J. L. (2009). *[Interleukin 6 in the physiopathology of rheumatoid arthritis]*. Reumatol Clin 5(1): 34-39.
- Paladini, F., N. Porciello, G. Camilli, S. Tuncer, E. Cocco, M. T. Fiorillo y R. Sorrentino (2014). *Single nucleotide polymorphisms in the 3'UTR of VPAC-1 cooperate in modulating gene expression and impact differently on the interaction with miR525-5p*. PLoS One 9(11): e112646.
- Palmer, J. B., F. M. Cuss y P. J. Barnes (1986). *VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways*. J Appl Physiol (1985) 61(4): 1322-1328.
- Paramarta, J. E., T. F. Heijda y D. L. Baeten (2013). *Fast relapse upon discontinuation of tumour necrosis factor blocking therapy in patients with peripheral spondyloarthritis*. Ann Rheum Dis 72(9): 1581-1582.
- Paramarta, J. E. y D. Baeten (2014). *Spondyloarthritis: from unifying concepts to improved treatment*. Rheumatology (Oxford) 53(9): 1547-1559.
- Passemar, S., P. Sokolowska, L. Schwendimann y P. Gressens (2011). *VIP-induced neuroprotection of the developing brain*. Curr Pharm Des 17(10): 1036-1039.
- Pauley, K. M., M. Satoh, A. L. Chan, M. R. Bubb, W. H. Reeves y E. K. Chan (2008). *Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Res Ther 10(4): R101.
- Pedersen, S. J., I. J. Sorensen, P. Garnero, J. S. Johansen, O. R. Madsen, N. Tvede, M. S. Hansen, G. Thamsborg, L. S. Andersen, O. Majgaard, et al. (2011a). *ASDAS, BASDAI and different treatment responses and their relation to biomarkers of inflammation, cartilage and bone turnover in patients with axial spondyloarthritis treated with TNFalpha inhibitors*. Ann Rheum Dis 70(8): 1375-1381.
- Pedersen, S. J., I. J. Sorensen, R. G. Lambert, K. G. Hermann, P. Garnero, J. S. Johansen, O. R. Madsen, A. Hansen, M. S. Hansen, G. Thamsborg, et al. (2011b). *Radiographic progression is associated with resolution of systemic inflammation in patients with axial spondylarthritis treated with tumor necrosis factor alpha inhibitors: a study of radiographic progression, inflammation on magnetic resonance imaging, and circulating biomarkers of inflammation, angiogenesis, and*

- cartilage and bone turnover. *Arthritis Rheum* 63(12): 3789-3800.
- Pei, L. (1996). Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. *J Biol Chem* 271(34): 20879-20884.
- Pérez-García, S., M. Carrión, R. Jimeno, A. M. Ortiz, I. González-Álvaro, J. Fernández, R. P. Gomariz y Y. Juarranz (2014). Urokinase plasminogen activator system in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients: modulation by inflammatory mediators and neuropeptides. *J Mol Neurosci* 52(1): 18-27.
- Pérez-García, S., M. Carrión, I. Gutiérrez-Cañas, I. González-Álvaro, R. P. Gomariz y Y. Juarranz (2016). VIP and CRF reduce ADAMTS expression and function in osteoarthritis synovial fibroblasts. *J Cell Mol Med* 20(4): 678-687.
- Petkov, V., W. Mosgoeller, R. Ziesche, M. Raderer, L. Stiebelhner, K. Vonbank, G. C. Funk, G. Hamilton, C. Novotny, B. Burian y L. H. Block (2003). Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 111(9): 1339-1346.
- Pietrosimone, K. M., M. Jin, B. Poston y P. Liu (2015). Collagen-Induced Arthritis: A model for Murine Autoimmune Arthritis. *Bio Protoc* 5(20).
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya y W. Filipowicz (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17(3): 118-126.
- Pincus, D. W., E. M. DiCicco-Bloom y I. B. Black (1990). Vasoactive intestinal peptide regulation of neuroblast mitosis and survival: role of cAMP. *Brain Res* 514(2): 355-357.
- Pincus, D. W., E. DiCicco-Bloom y I. B. Black (1994). Trophic mechanisms regulate mitotic neuronal precursors: role of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Brain Res* 663(1): 51-60.
- Pisegna, J. R. y S. A. Wank (1993). Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13): 6345-6349.
- Poddubnyy, D., H. Haibel, J. Listing, E. Marker-Hermann, H. Zeidler, J. Braun, J. Sieper y M. Rudwaleit (2012). Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 64(5): 1388-1398.
- Poddubnyy, D. y M. Rudwaleit (2012). Early spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 38(2): 387-403.
- Poddubnyy, D., K. Conrad, H. Haibel, U. Syrbe, H. Appel, J. Braun, M. Rudwaleit y J. Sieper (2014a). Elevated serum level of the vascular endothelial growth factor predicts radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 73(12): 2137-2143.
- Poddubnyy, D., K. G. Hermann, J. Callhoff, J. Listing y J. Sieper (2014b). Ustekinumab for the treatment of patients with active ankylosing spondylitis: results of a 28-week, prospective, open-label, proof-of-concept study (TOPAS). *Ann Rheum Dis* 73(5): 817-823.
- Poddubnyy, D. A., M. Rudwaleit, J. Listing, J. Braun y J. Sieper (2010). Comparison of a high sensitivity and standard C reactive protein measurement in patients with ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 69(7): 1338-1341.
- Pointon, J. J., D. Harvey, T. Karaderi, L. H. Appleton, C. Farrar, M. A. Stone, R. D. Sturrock, J. D. Reveille, M. H. Weisman, M. M. Ward, M. A. Brown y B. P. Wordsworth (2010). The chromosome 16q region associated with ankylosing spondylitis includes the candidate gene tumour necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD). *Ann Rheum Dis* 69(6): 1243-1246.
- Potter, C., K. L. Hyrich, A. Tracey, M. Lunt, D. Plant, D. P. Symmons, W. Thomson, J. Worthington, P. Emery, A. W. Morgan, A. G. Wilson, J. Isaacs, A. Barton y Braggss (2009). Association of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide positivity, but not carriage of shared epitope or PTPN22 susceptibility variants, with anti-tumour necrosis factor response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68(1): 69-74.
- Prasse, A., G. Zissel, N. Lutzen, J. Schupp, R. Schmiedlin, E. González-Rey, A. Rensing-Ehl, G. Bacher, V. Cavalli, D. Bevec, M. Delgado y J. Müller-Quernheim (2010). Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182(4): 540-548.
- Pratesi, F., I. Dioni, C. Tommasi, M. C. Alcaro, I. Paolini, F. Barbetti, F. Boscaro, F. Panza, I. Puxeddu, P. Rovero y P. Migliorini (2014). Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis* 73(7): 1414-1422.
- Pratesi, F. y P. Migliorini (2014). Something old, something new: biomarkers in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 41(11): 2091-2093.
- Prevoo, M. L., M. A. van 't Hof, H. H. Kuper, M. A. van Leeuwen, L. B. van de Putte y P. L. van Riel (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a

prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 38(1): 44-48.

Prevosto, C., J. C. Goodall y J. S. Hill Gaston (2012). *Cytokine secretion by pathogen recognition receptor-stimulated dendritic cells in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis.* J Rheumatol 39(10): 1918-1928.

Prieto-Perez, R., T. Cabaleiro, E. Dauden y F. Abad-Santos (2013). *Gene polymorphisms that can predict response to anti-TNF therapy in patients with psoriasis and related autoimmune diseases.* Pharmacogenomics J 13(4): 297-305.

Prieto, J. C., M. Laburthe y G. Rosselin (1979). *Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 1. Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites.* Eur J Biochem 96(2): 229-237.

Qu, F., H. J. Liu, Y. Xiang, Y. R. Tan, C. Liu, X. L. Zhu y X. Q. Qin (2011). *Activation of CFTR trafficking and gating by vasoactive intestinal peptide in human bronchial epithelial cells.* J Cell Biochem 112(3): 902-908.

Radner, H., J. S. Smolen y D. Aletaha (2014). *Remission in rheumatoid arthritis: benefit over low disease activity in patient-reported outcomes and costs.* Arthritis Res Ther 16(1): R56.

Radstake, T. R., F. C. Sweep, P. Welsing, B. Franke, S. H. Vermeulen, A. Geurts-Moespot, T. Calandra, R. Donn y P. L. van Riel (2005). *Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and circulating levels of macrophage migration inhibitory factor.* Arthritis Rheum 52(10): 3020-3029.

Rafferty, S., N. Alcolado, C. Norez, F. Chappe, S. Pelzer, F. Becq y V. Chappe (2009). *Rescue of functional F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by vasoactive intestinal peptide in the human nasal epithelial cell line JME/CF15.* J Pharmacol Exp Ther 331(1): 2-13.

Rameshwar, P., P. Gascon, H. S. Oh, T. N. Denny, G. Zhu y D. Ganea (2002). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits the proliferation of bone marrow progenitors through the VPAC1 receptor.* Exp Hematol 30(9): 1001-1009.

Ramiro, S., D. van der Heijde, A. van Tubergen, C. Stolwijk, M. Dougados, F. van den Bosch y R. Landewe (2014). *Higher disease activity leads to more structural damage in the spine in ankylosing spondylitis: 12-year longitudinal data from the OASIS cohort.* Ann Rheum Dis 73(8): 1455-1461.

Ramiro, S., R. Landewe, A. van Tubergen, A. Boonen, C. Stolwijk, M. Dougados, F. van den Bosch y D. van der Heijde (2015a). *Lifestyle factors may modify the*

effect of disease activity on radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a longitudinal analysis. RMD Open 1(1): e000153.

Ramiro, S., C. Stolwijk, A. van Tubergen, D. van der Heijde, M. Dougados, F. van den Bosch y R. Landewe (2015b). *Evolution of radiographic damage in ankylosing spondylitis: a 12 year prospective follow-up of the OASIS study.* Ann Rheum Dis 74(1): 52-59.

Raychaudhuri, S., C. Sandor, E. A. Stahl, J. Freudenberg, H. S. Lee, X. Jia, L. Alfredsson, L. Padyukov, L. Klareskog, J. Worthington, et al. (2012). *Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis.* Nat Genet 44(3): 291-296.

Raychaudhuri, S. P. y A. Deodhar (2014). *The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis.* J Autoimmun 48-49: 128-133.

Raychaudhuri, S. P. y S. K. Raychaudhuri (2016). *IL-23/IL-17 axis in spondyloarthritis-bench to bedside.* Clin Rheumatol 35(6): 1437-1441.

Raza, K., F. Falciani, S. J. Curnow, E. J. Ross, C. Y. Lee, A. N. Akbar, J. M. Lord, C. Gordon, C. D. Buckley y M. Salmon (2005). *Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin.* Arthritis Res Ther 7(4): R784-795.

Raza, K. y A. Filer (2009). *Predicting the development of RA in patients with early undifferentiated arthritis.* Best Pract Res Clin Rheumatol 23(1): 25-36.

Raza, K. (2010). *The Michael Mason prize: early rheumatoid arthritis--the window narrows.* Rheumatology (Oxford) 49(3): 406-410.

Raza, K., T. P. Saber, T. K. Kvien, P. P. Tak y D. M. Gerlag (2012). *Timing the therapeutic window of opportunity in early rheumatoid arthritis: proposal for definitions of disease duration in clinical trials.* Ann Rheum Dis 71(12): 1921-1923.

Reed, H. E., D. J. Cutler, T. M. Brown, J. Brown, C. W. Coen y H. D. Piggins (2002). *Effects of vasoactive intestinal polypeptide on neurones of the rat suprachiasmatic nuclei in vitro.* J Neuroendocrinol 14(8): 639-646.

Ridder, K., S. Keller, M. Dams, A. K. Rupp, J. Schlaudraff, D. Del Turco, J. Starmann, J. Macas, D. Karpova, K. Devraj, et al. (2014). *Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation.* PLoS Biol 12(6): e1001874.

- Rincon, M. (2012). *Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases*. Trends Immunol 33(11): 571-577.
- Rioja, I., F. J. Hughes, C. H. Sharp, L. C. Warnock, D. S. Montgomery, M. Akil, A. G. Wilson, M. H. Binks y M. C. Dickson (2008). *Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor alpha, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor*. Arthritis Rheum 58(8): 2257-2267.
- Riou, F., R. Cespuglio y M. Jouvet (1981). *[Hypnogenic properties of the vasoactive intestinal polypeptide in rats]*. C R Seances Acad Sci III 293(12): 679-682.
- Robbins, P. D. y A. E. Morelli (2014). *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. Nat Rev Immunol 14(3): 195-208.
- Robinson, W. H., T. M. Lindstrom, R. K. Cheung y J. Sokolove (2013). *Mechanistic biomarkers for clinical decision making in rheumatic diseases*. Nat Rev Rheumatol 9(5): 267-276.
- Robinson, W. H. y R. Mao (2016). *Biomarkers to guide clinical therapeutics in rheumatology?* Curr Opin Rheumatol 28(2): 168-175.
- Romero, V., J. Fert-Bober, P. A. Nigrovic, E. Darrah, U. J. Haque, D. M. Lee, J. van Eyk, A. Rosen y F. Andrade (2013). *Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis*. Sci Transl Med 5(209): 209ra150.
- Rose, H. M., C. Ragan y et al. (1948). *Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis*. Proc Soc Exp Biol Med 68(1): 1-6.
- Rudwaleit, M., P. Claudepierre, P. Wordsworth, E. L. Cortina, J. Sieper, M. Kron, R. Carcereri-De-Prati, H. Kupper y S. Kary (2009a). *Effectiveness, safety, and predictors of good clinical response in 1250 patients treated with adalimumab for active ankylosing spondylitis*. J Rheumatol 36(4): 801-808.
- Rudwaleit, M., R. Landewe, D. van der Heijde, J. Listing, J. Brandt, J. Braun, R. Burgos-Vargas, E. Collantes-Estevez, J. Davis, B. Dijkmans, et al. (2009b). *The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal*. Ann Rheum Dis 68(6): 770-776.
- Rudwaleit, M. (2010). *New approaches to diagnosis and classification of axial and peripheral spondyloarthritis*. Curr Opin Rheumatol 22(4): 375-380.
- Saad, C. G., A. C. Ribeiro, J. C. Moraes, L. Takayama, C. R. Goncalves, M. B. Rodrigues, R. M. de Oliveira, C. A. Silva, E. Bonfa y R. M. Pereira (2012). *Low sclerostin levels: a predictive marker of persistent inflammation in ankylosing spondylitis during anti-tumor necrosis factor therapy?* Arthritis Res Ther 14(5): R216.
- Sabeh, F., D. Fox y S. J. Weiss (2010). *Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synovial function*. J Immunol 184(11): 6396-6406.
- Saferding, V., A. Puchner, E. Goncalves-Alves, M. Hofmann, M. Bonelli, J. S. Brunner, E. Sahin, B. Niederreiter, S. Hayer, H. P. Kiener, et al. (2017). *MicroRNA-146a governs fibroblast activation and joint pathology in arthritis*. J Autoimmun 82: 74-84.
- Sagawa A., K. M., Gui Y., Marotta A., Arai J. (2014). *Evaluation of Serum 14-3-3Eta Levels in A Japanese RA Cohort Treated with Tocilizumab*. Ann Rheum Dis 73(Suppl. 2): 260.
- Said, S. I. y V. Mutt (1970). *Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut*. Nature 225(5235): 863-864.
- Said, S. I. y R. N. Rosenberg (1976). *Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue*. Science 192(4242): 907-908.
- Said, S. I. (1986). *Vasoactive intestinal peptide*. J Endocrinol Invest 9(2): 191-200.
- Said, S. I., S. A. Hamidi, K. G. Dickman, A. M. Szema, S. Lyubsky, R. Z. Lin, Y. P. Jiang, J. J. Chen, J. A. Waschek y S. Kort (2007). *Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene*. Circulation 115(10): 1260-1268.
- Samarasinghe, A. E., S. A. Hoselton y J. M. Schuh (2011). *The absence of VPAC2 leads to aberrant antibody production in Aspergillus fumigatus sensitized and challenged mice*. Peptides 32(1): 131-137.
- Scott, D. L., F. Wolfe y T. W. Huizinga (2010). *Rheumatoid arthritis*. Lancet 376(9746): 1094-1108.
- Schett, G., M. Stolina, D. Dwyer, D. Zack, S. Uderhardt, G. Kronke, P. Kostenuik y U. Feige (2009). *Tumor necrosis factor alpha and RANKL blockade cannot halt bony spur formation in experimental inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum 60(9): 2644-2654.
- Schett, G. y G. S. Firestein (2010). *Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis 69(5): 787-789.

- Schett, G., J. M. Dayer y B. Manger (2016). *Interleukin-1 function and role in rheumatic disease*. Nat Rev Rheumatol 12(1): 14-24.
- Schett, G. (2017). *Autoimmunity as a trigger for structural bone damage in rheumatoid arthritis*. Mod Rheumatol 27(2): 193-197.
- Schiotis, R., N. Bartolome, A. Sanchez, M. Szczypiorska, J. Sanz, E. Cuende, E. Collantes Estevez, A. Martinez, D. Tejedor, M. Artieda, A. Buzoianu y J. Mulero (2012). *Both baseline clinical factors and genetic polymorphisms influence the development of severe functional status in ankylosing spondylitis*. PLoS One 7(9): e43428.
- Schoels, M., D. Aletaha, J. S. Smolen y J. B. Wong (2012). *Comparative effectiveness and safety of biological treatment options after tumour necrosis factor alpha inhibitor failure in rheumatoid arthritis: systematic review and indirect pairwise meta-analysis*. Ann Rheum Dis 71(8): 1303-1308.
- Schoels, M. M., J. Braun, M. Dougados, P. Emery, O. Fitzgerald, A. Kavanaugh, T. K. Kvien, R. Landewe, T. Luger, P. Mease, et al. (2014). *Treating axial and peripheral spondyloarthritis, including psoriatic arthritis, to target: results of a systematic literature search to support an international treat-to-target recommendation in spondyloarthritis*. Ann Rheum Dis 73(1): 238-242.
- Schwartz, D. M., M. Bonelli, M. Gadina y J. J. O'Shea (2016). *Type I/II cytokines, JAKs, and new strategies for treating autoimmune diseases*. Nat Rev Rheumatol 12(1): 25-36.
- Seegobin, S. D., M. H. Ma, C. Dahanayake, A. P. Cope, D. L. Scott, C. M. Lewis y I. C. Scott (2014). *ACPA-positive and ACPA-negative rheumatoid arthritis differ in their requirements for combination DMARDs and corticosteroids: secondary analysis of a randomized controlled trial*. Arthritis Res Ther 16(1): R13.
- Sellam, J., H. Hendel-Chavez, S. Rouanet, K. Abbed, B. Combe, X. Le Loet, J. Tebib, J. Sibilia, Y. Taoufik, M. Dougados y X. Mariette (2011). *B cell activation biomarkers as predictive factors for the response to rituximab in rheumatoid arthritis: a six-month, national, multicenter, open-label study*. Arthritis Rheum 63(4): 933-938.
- Sena, M., D. T. Bravo, D. v. Agoston y J. A. Waschek (1994). *High conservation of upstream regulatory sequences on the human and mouse vasoactive intestinal peptide (VIP) genes*. DNA Sequence 5(1): 25-29.
- SER, S. E. d. R. (2014). *Manual de las enfermedades reumáticas (6ª Edición)*. Ed. Elsevier España, S.L.: 659.
- Seregin, S. S., D. P. Rastall, I. Evnouchidou, C. F. Aylsworth, D. Quiroga, R. P. Kamal, S. Godbehere-Roosa, C. F. Blum, I. A. York, E. Stratikos y A. Amalfitano (2013). *Endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 alleles associated with increased risk of ankylosing spondylitis reduce HLA-B27 mediated presentation of multiple antigens*. Autoimmunity 46(8): 497-508.
- Shahouri, S. H., K. Michaud, T. R. Mikuls, L. Caplan, T. S. Shaver, J. D. Anderson, D. N. Weidensaul, R. E. Busch, S. Wang y F. Wolfe (2011). *Remission of rheumatoid arthritis in clinical practice: application of the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism 2011 remission criteria*. Arthritis Rheum 63(11): 3204-3215.
- Sherlock, J. P., B. Joyce-Shaikh, S. P. Turner, C. C. Chao, M. Sathe, J. Grein, D. M. Gorman, E. P. Bowman, T. K. McClanahan, J. H. Yearley, et al. (2012). *IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR-gammat+ CD3+CD4-CD8- entheselial resident T cells*. Nat Med 18(7): 1069-1076.
- Sherlock, J. P., P. C. Taylor y C. D. Buckley (2015a). *The biology of IL-23 and IL-17 and their therapeutic targeting in rheumatic diseases*. Curr Opin Rheumatol 27(1): 71-75.
- Sherlock, J. P., P. C. Taylor, C. D. Buckley y D. J. Cua (2015b). *Spondyloarthropathy: interleukin 23 and disease modification*. The Lancet 385(9982): 2017-2018.
- Sherwood, N. M., S. L. Krueckl y J. E. McRory (2000). *The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily*. Endocr Rev 21(6): 619-670.
- Shetzline, M. A., J. K. Walker, K. J. Valenzano y R. T. Premont (2002). *Vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor regulation. Desensitization, phosphorylation, and sequestration*. J Biol Chem 277(28): 25519-25526.
- Sheward, W. J., E. M. Lutz y A. J. Harmar (1995). *The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization*. Neuroscience 67(2): 409-418.
- Shi, J., R. Knevel, P. Suwannahai, M. P. van der Linden, G. M. Janssen, P. A. van Veelen, N. E. Levarht, A. H. van der Helm-van Mil, A. Cerami, T. W. Huizinga, R. E. Toes y L. A. Trouw (2011). *Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage*. Proc Natl Acad Sci U S A 108(42): 17372-17377.
- Shi, J., L. A. van de Stadt, E. W. Levarht, T. W. Huizinga, R. E. Toes, L. A. Trouw y D. van Schaardenburg (2013). *Anti-carbamylated protein antibodies are present in arthralgia patients and*

predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 65(4): 911-915.

Shi, J., L. A. van de Stadt, E. W. Levarht, T. W. Huizinga, D. Hamann, D. van Schaardenburg, R. E. Toes y L. A. Trouw (2014). *Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis 73(4): 780-783.

Shimamoto, K., T. Ito, Y. Ozaki, H. Amuro, A. Tanaka, T. Nishizawa, Y. Son, M. Inaba y S. Nomura (2013). *Serum interleukin 6 before and after therapy with tocilizumab is a principal biomarker in patients with rheumatoid arthritis.* J Rheumatol 40(7): 1074-1081.

Sieper, J., H. Appel, J. Braun y M. Rudwaleit (2008). *Critical appraisal of assessment of structural damage in ankylosing spondylitis: implications for treatment outcomes.* Arthritis Rheum 58(3): 649-656.

Sieper, J. (2012). *How to define remission in ankylosing spondylitis?* Ann Rheum Dis 71 Suppl 2: i93-95.

Sieper, J., D. van der Heijde, M. Dougados, P. J. Mease, W. P. Maksymowych, M. A. Brown, V. Arora y A. L. Pangan (2013). *Efficacy and safety of adalimumab in patients with non-radiographic axial spondyloarthritis: results of a randomised placebo-controlled trial (ABILITY-1).* Ann Rheum Dis 72(6): 815-822.

Sieper, J., J. Lenaerts, J. Wollenhaupt, M. Rudwaleit, V. I. Mazurov, L. Myasoutova, S. Park, Y. Song, R. Yao, D. Chitkara, N. Vastesaeger y I. I. All (2014a). *Efficacy and safety of infliximab plus naproxen versus naproxen alone in patients with early, active axial spondyloarthritis: results from the double-blind, placebo-controlled INFAST study, Part 1.* Ann Rheum Dis 73(1): 101-107.

Sieper, J., J. Lenaerts, J. Wollenhaupt, M. Rudwaleit, V. I. Mazurov, L. Myasoutova, S. Park, Y. Song, R. Yao, D. Chitkara, N. Vastesaeger y I. I. All (2014b). *Maintenance of biologic-free remission with naproxen or no treatment in patients with early, active axial spondyloarthritis: results from a 6-month, randomised, open-label follow-up study, INFAST Part 2.* Ann Rheum Dis 73(1): 108-113.

Sieper, J. y D. Poddubnyy (2016). *New evidence on the management of spondyloarthritis.* Nat Rev Rheumatol 12(5): 282-295.

Sims, A. M., A. E. Timms, J. Bruges-Armas, R. Burgos-Vargas, C. T. Chou, T. Doan, A. Dowling, R. N. Fialho, P. Gergely, D. D. Gladman, et al. (2008). *Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis.* Ann Rheum Dis 67(9): 1305-1309.

Skinningsrud, B., B. A. Lie, E. S. Husebye, T. K. Kvien, O. Forre, B. Flato, A. Stormyr, G. Joner, P. R. Njolstad, T. Egeland y D. E. Undlien (2010). *A CLEC16A variant confers risk for juvenile idiopathic arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis 69(8): 1471-1474.

Smith, M. D. (2011). *The normal synovium.* Open Rheumatol J 5: 100-106.

Smolen, J. S., F. C. Breedveld, M. H. Schiff, J. R. Kalden, P. Emery, G. Eberl, P. L. van Riel y P. Tugwell (2003). *A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice.* Rheumatology (Oxford) 42(2): 244-257.

Smolen, J. S., D. Aletaha, J. Grisar, K. Redlich, G. Steiner y O. Wagner (2008). *The need for prognosticators in rheumatoid arthritis. Biological and clinical markers: where are we now?* Arthritis Res Ther 10(3): 208.

Smolen, J. S. y D. Aletaha (2010). *The assessment of disease activity in rheumatoid arthritis.* Clin Exp Rheumatol 28(3 Suppl 59): S18-27.

Smolen, J. S., D. Aletaha, J. W. Bijlsma, F. C. Breedveld, D. Boumpas, G. Burmester, B. Combe, M. Cutolo, M. de Wit, M. Dougados, et al. (2010). *Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force.* Ann Rheum Dis 69(4): 631-637.

Smolen, J. S., D. Aletaha y K. Redlich (2012). *The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data?* Nat Rev Rheumatol 8(4): 235-243.

Smolen, J. S. y D. Aletaha (2013). *Forget personalised medicine and focus on abating disease activity.* Ann Rheum Dis 72(1): 3-6.

Smolen, J. S., J. Braun, M. Dougados, P. Emery, O. Fitzgerald, P. Helliwell, A. Kavanaugh, T. K. Kvien, R. Landewe, T. Luger, et al. (2014a). *Treating spondyloarthritis, including ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis, to target: recommendations of an international task force.* Ann Rheum Dis 73(1): 6-16.

Smolen, J. S., R. Landewe, F. C. Breedveld, M. Buch, G. Burmester, M. Dougados, P. Emery, C. Gaujoux-Viala, L. Gossec, J. Nam, et al. (2014b). *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update.* Ann Rheum Dis 73(3): 492-509.

Smolen, J. S. y D. Aletaha (2015). *Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges.* Nat Rev Rheumatol 11(5): 276-289.

- Smolen, J. S., D. Aletaha y I. B. McInnes (2016a). *Rheumatoid arthritis*. The Lancet 388(10055): 2023-2038.
- Smolen, J. S., F. C. Breedveld, G. R. Burmester, V. Bykerk, M. Dougados, P. Emery, T. K. Kvien, M. V. Navarro-Compan, S. Oliver, M. Schoels, et al. (2016b). *Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force*. Ann Rheum Dis 75(1): 3-15.
- Sokolove, J., D. S. Johnson, L. J. Lahey, C. A. Wagner, D. Cheng, G. M. Thiele, K. Michaud, H. Sayles, A. M. Reimold, L. Caplan, G. W. Cannon, G. Kerr, T. R. Mikuls y W. H. Robinson (2014). *Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheumatol 66(4): 813-821.
- Sokolove, J., C. A. Wagner, L. J. Lahey, H. Sayles, M. J. Duryee, A. M. Reimold, G. Kerr, W. H. Robinson, G. W. Cannon, G. M. Thiele y T. R. Mikuls (2016). *Increased inflammation and disease activity among current cigarette smokers with rheumatoid arthritis: a cross-sectional analysis of US veterans*. Rheumatology (Oxford) 55(11): 1969-1977.
- Solomon, D. H., A. Bitton, J. N. Katz, H. Radner, E. M. Brown y L. Fraenkel (2014). *Review: treat to target in rheumatoid arthritis: fact, fiction, or hypothesis?* Arthritis Rheumatol 66(4): 775-782.
- Song, I. H., C. E. Althoff, H. Haibel, K. G. Hermann, D. Poddubnyy, J. Listing, A. Weiss, S. Djacenko, G. R. Burmester, M. Bohl-Buhler, B. Freundlich, M. Rudwaleit y J. Sieper (2012). *Frequency and duration of drug-free remission after 1 year of treatment with etanercept versus sulfasalazine in early axial spondyloarthritis: 2 year data of the ESTHER trial*. Ann Rheum Dis 71(7): 1212-1215.
- Sorg, O. y P. J. Magistretti (1992). *Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition*. J Neurosci 12(12): 4923-4931.
- Souza-Moreira, L., J. Campos-Salinas, M. Caro y E. Gonzalez-Rey (2011). *Neuropeptides as pleiotropic modulators of the immune response*. Neuroendocrinology 94(2): 89-100.
- Spector, N. H. (1987). *Old and new strategies in the conditioning of immune responses*. Ann NY Acad Sci 496: 522-531.
- Stack, R. J., L. H. D. van Tuyl, M. Sloots, L. A. van de Stadt, W. Hoogland, B. Maat, C. D. Mallen, R. Tiwana, K. Raza y D. van Schaardenburg (2014). *Symptom complexes in patients with seropositive arthralgia and in patients newly diagnosed with rheumatoid arthritis: a qualitative exploration of symptom development*. Rheumatology 53(9): 1646-1653.
- Stamp, L. K., P. T. Chapman, J. L. O'Donnell, M. Zhang, J. James, C. Frampton, M. L. Barclay, M. A. Kennedy y R. L. Roberts (2010). *Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate*. Pharmacogenet Genomics 20(6): 367-376.
- Staun-Olsen, P., B. Ottesen, P. D. Bartels, M. H. Nielsen, S. Gammeltoft y J. Fahrenkrug (1982). *Receptors for vasoactive intestinal polypeptide on isolated synaptosomes from rat cerebral cortex. Heterogeneity of binding and desensitization of receptors*. J Neurochem 39(5): 1242-1251.
- Stoll, M. L. (2011). *Interactions of the innate and adaptive arms of the immune system in the pathogenesis of spondyloarthritis*. Clin Exp Rheumatol 29(2): 322-330.
- Straub, R. H., J. W. Bijlsma, A. Masi y M. Cutolo (2013). *Role of neuroendocrine and neuroimmune mechanisms in chronic inflammatory rheumatic diseases--the 10-year update*. Semin Arthritis Rheum 43(3): 392-404.
- Studenic, P., H. Radner, J. S. Smolen y D. Aletaha (2012). *Discrepancies between patients and physicians in their perceptions of rheumatoid arthritis disease activity*. Arthritis Rheum 64(9): 2814-2823.
- Sun, W., J. Hong, Y. C. Zang, X. Liu y J. Z. Zhang (2006). *Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis*. Int Immunol 18(12): 1691-1700.
- Suwannalai, P., K. Britsemmer, R. Knevel, H. U. Scherer, E. W. Levarht, A. H. van der Helm-van Mil, D. van Schaardenburg, T. W. Huizinga, R. E. Toes y L. A. Trouw (2014). *Low-avidity anticitrullinated protein antibodies (ACPA) are associated with a higher rate of joint destruction in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis 73(1): 270-276.
- Sweeney, S. E. y G. S. Firestein (2004). *Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation*. Int J Biochem Cell Biol 36(3): 372-378.
- Symes, A., T. Gearan, J. Eby y J. S. Fink (1997). *Integration of Jak-Stat and AP-1 signaling pathways at the vasoactive intestinal peptide cytokine response element regulates ciliary neurotrophic factor-dependent transcription*. J Biol Chem 272(15): 9648-9654.
- Syversen, S. W., G. L. Goll, D. van der Heijde, R. Landewe, P. I. Gaarder, S. Odegard, E. A. Haavardsholm y T. K. Kvien (2009). *Cartilage and bone biomarkers in rheumatoid arthritis: prediction of 10-year radiographic progression*. J Rheumatol 36(2): 266-272.

- Syversen, S. W., G. L. Goll, D. van der Heijde, R. Landewe, B. A. Lie, S. Odegard, T. Uhlig, P. I. Gaarder y T. K. Kvien (2010). *Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: results from a 10-year prospective study*. *Ann Rheum Dis* 69(2): 345-351.
- Szema, A. M., S. A. Hamidi, S. Lyubsky, K. G. Dickman, S. Mathew, T. Abdel-Razek, J. J. Chen, J. A. Waschek y S. I. Said (2006). *Mice lacking the VIP gene show airway hyperresponsiveness and airway inflammation, partially reversible by VIP*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(5): L880-886.
- Szodoray, P., Z. Szabo, A. Kapitany, A. Gyetvai, G. Lakos, S. Szanto, G. Szucs y Z. Szekanecz (2010). *Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev* 9(3): 140-143.
- Tachibana, T., E. S. Saito, H. Takahashi, S. Saito, S. Tomonaga, T. Boswell y M. Furuse (2004). *Anorexigenic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in the chick brain are mediated by corticotrophin-releasing factor*. *Regul Pept* 120(1-3): 99-105.
- Tam, E. K., G. M. Franconi, J. A. Nadel y G. H. Caughey (1990). *Protease inhibitors potentiate smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in isolated human bronchi*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2(5): 449-452.
- Tan, E. M. y J. S. Smolen (2016). *Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor*. *J Exp Med* 213(10): 1937-1950.
- Tan, Y. V. y J. A. Waschek (2011). *Targeting VIP and PACAP receptor signalling: new therapeutic strategies in multiple sclerosis*. *ASN Neuro* 3(4).
- Tan, Y. V., C. Abad, Y. Wang, R. Lopez y J. Waschek (2015). *VPAC2 (vasoactive intestinal peptide receptor type 2) receptor deficient mice develop exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis with increased Th1/Th17 and reduced Th2/Treg responses*. *Brain Behav Immun* 44: 167-175.
- Tanaka, T., M. Narazaki y T. Kishimoto (2014). *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10): a016295.
- Taurog, J. D., M. L. Dorris, N. Satumtira, T. M. Tran, R. Sharma, R. Dressel, J. van den Brandt y H. M. Reichardt (2009). *Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8*. *Arthritis Rheum* 60(7): 1977-1984.
- Toccafondi, R. S., M. L. Brandi y A. Melander (1984). *Vasoactive intestinal peptide stimulation of human thyroid cell function*. *J Clin Endocrinol Metab* 58(1): 157-160.
- Toledano, E., M. J. García de Yébenes, I. González-Álvarez y L. Carmona (2017). *Severity indices in rheumatoid arthritis: A systematic review*. *Reumatol Clin*.
- Too, C. L., A. Yahya, S. Murad, J. S. Dhaliwal, P. T. Larsson, N. A. Muhamad, N. A. Abdullah, A. N. Mustafa, L. Klareskog, L. Alfredsson, L. Padyukov, C. Bengtsson y E. s. g. My (2012). *Smoking interacts with HLA-DRB1 shared epitope in the development of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: results from the Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (MyEIRA)*. *Arthritis Res Ther* 14(2): R89.
- Toscano, M. G., M. Delgado, W. Kong, F. Martin, M. Skarica y D. Ganea (2010). *Dendritic cells transduced with lentiviral vectors expressing VIP differentiate into VIP-secreting tolerogenic-like DCs*. *Mol Ther* 18(5): 1035-1045.
- Tran, C. N., M. J. Davis, L. A. Tesmer, J. L. Endres, C. D. Motyl, C. Smuda, E. C. Somers, K. C. Chung, A. G. Urquhart, S. K. Lundy, S. Kovats y D. A. Fox (2007). *Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes*. *Arthritis Rheum* 56(5): 1497-1506.
- Trouw, L. A., E. M. Haisma, E. W. Levarht, D. van der Woude, A. Ioan-Facsinay, M. R. Daha, T. W. Huizinga y R. E. Toes (2009). *Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways*. *Arthritis Rheum* 60(7): 1923-1931.
- Tsui, F. W., H. W. Tsui, F. Las Heras, K. P. Pritzker y R. D. Inman (2014). *Serum levels of novel noggin and sclerostin-immune complexes are elevated in ankylosing spondylitis*. *Ann Rheum Dis* 73(10): 1873-1879.
- Tsukada, T., S. J. Horovitch, M. R. Montminy, G. Mandel y R. H. Goodman (1985). *Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene*. *DNA* 4(4): 293-300.
- Tsukada, T., J. S. Fink, G. Mandel y R. H. Goodman (1987). *Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP*. *J Biol Chem* 262(18): 8743-8747.
- Turina, M. C., J. Sieper, N. Yeremenko, K. Conrad, H. Haibel, M. Rudwaleit, D. Baeten y D. Poddubnyy (2014a). *Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis*. *Ann Rheum Dis* 73(9): 1746-1748.

- Turina, M. C., N. Yeremenko, J. E. Paramarta, L. De Rycke y D. Baeten (2014b). *Calprotectin (S100A8/9) as serum biomarker for clinical response in proof-of-concept trials in axial and peripheral spondyloarthritis*. *Arthritis Res Ther* 16(4): 413.
- Turina, M. C., N. Yeremenko, F. van Gaalen, M. van Oosterhout, I. J. Berg, R. Ramonda, C. M. Lebre, R. Landewe y D. Baeten (2017). *Serum inflammatory biomarkers fail to identify early axial spondyloarthritis: results from the SpondyloArthritis Caught Early (SPACE) cohort*. *RMD Open* 3(1): e000319.
- Turner, M. J., D. P. Sowders, M. L. DeLay, R. Mohapatra, S. Bai, J. A. Smith, J. R. Brandewie, J. D. Taurog y R. A. Colbert (2005). *HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response*. *J Immunol* 175(4): 2438-2448.
- Usdin, T. B., T. I. Bonner y E. Mezey (1994). *Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions*. *Endocrinology* 135(6): 2662-2680.
- Vacas, E., A. M. Bajo, A. V. Schally, M. Sanchez-Chapado, J. C. Prieto y M. J. Carmena (2013). *Vasoactive intestinal peptide induces oxidative stress and suppresses metastatic potential in human clear cell renal cell carcinoma*. *Mol Cell Endocrinol* 365(2): 212-222.
- Vacic, V., S. McCarthy, D. Malhotra, F. Murray, H. H. Chou, A. Peoples, V. Makarov, S. Yoon, A. Bhandari, R. Corominas, et al. (2011). *Duplications of the neuropeptide receptor gene VIPR2 confer significant risk for schizophrenia*. *Nature* 471(7339): 499-503.
- Valdehita, A., A. M. Bajo, A. B. Fernandez-Martinez, M. I. Arenas, E. Vacas, P. Valenzuela, A. Ruiz-Villaespesa, J. C. Prieto y M. J. Carmena (2010). *Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer*. *Peptides* 31(11): 2035-2045.
- van Baarsen, L. G., W. H. Bos, F. Rustenburg, T. C. van der Pouw Kraan, G. J. Wolbink, B. A. Dijkmans, D. van Schaardenburg y C. L. Verweij (2010). *Gene expression profiling in autoantibody-positive patients with arthralgia predicts development of arthritis*. *Arthritis Rheum* 62(3): 694-704.
- van de Sande, M. G., D. M. Gerlag, B. M. Lodde, L. G. van Baarsen, S. Alivernini, V. Codullo, I. Felea, E. Vieira-Sousa, U. Fearon, R. Reece, et al. (2011). *Evaluating antirheumatic treatments using synovial biopsy: a recommendation for standardisation to be used in clinical trials*. *Ann Rheum Dis* 70(3): 423-427.
- van der Heijde, D., B. Dijkmans, P. Geusens, J. Sieper, K. DeWoody, P. Williamson, J. Braun y G. Ankylosing Spondylitis Study for the Evaluation of Recombinant Infliximab Therapy Study (2005). *Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, placebo-controlled trial (ASSERT)*. *Arthritis Rheum* 52(2): 582-591.
- van der Heijde, D. y R. Landewe (2005). *Selection of a method for scoring radiographs for ankylosing spondylitis clinical trials, by the Assessment in Ankylosing Spondylitis Working Group and OMERACT*. *J Rheumatol* 32(10): 2048-2049.
- van der Heijde, D., A. Kivitz, M. H. Schiff, J. Sieper, B. A. Dijkmans, J. Braun, M. Dougados, J. D. Reveille, R. L. Wong, H. Kupper, J. C. Davis, Jr. y A. S. Group (2006). *Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *Arthritis Rheum* 54(7): 2136-2146.
- van der Heijde, D., A. Kavanaugh, D. D. Gladman, C. Antoni, G. G. Krueger, C. Guzzo, B. Zhou, L. T. Dooley, K. de Vlam, P. Geusens, C. Birbara, D. Halter y A. Beutler (2007). *Infliximab inhibits progression of radiographic damage in patients with active psoriatic arthritis through one year of treatment: Results from the induction and maintenance psoriatic arthritis clinical trial 2*. *Arthritis Rheum* 56(8): 2698-2707.
- van der Heijde, D., D. Salonen, B. N. Weissman, R. Landewe, W. P. Maksymowych, H. Kupper, S. Ballal, E. Gibson, R. Wong, g. Canadian study y A. s. group (2009). *Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years*. *Arthritis Res Ther* 11(4): R127.
- van der Heijde, D. M., M. van 't Hof, P. L. van Riel y L. B. van de Putte (1993). *Validity of single variables and indices to measure disease activity in rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol* 20(3): 538-541.
- van der Helm-van Mil, A. H., K. N. Verpoort, F. C. Breedveld, R. E. Toes y T. W. Huizinga (2005). *Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther* 7(5): R949-958.
- van der Helm-van Mil, A. H. (2014). *Risk estimation in rheumatoid arthritis: from bench to bedside*. *Nat Rev Rheumatol* 10(3): 171-180.
- Van Mechelen, M. y R. J. Lories (2016). *Microtrauma: no longer to be ignored in spondyloarthritis?* *Curr Opin Rheumatol* 28(2): 176-180.
- van Nies, J. A., A. Krabben, J. W. Schoones, T. W. Huizinga, M. Kloppenburg y A. H. van der Helm-van Mil (2014). *What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review*. *Ann Rheum Dis* 73(5): 861-870.

- van Nies, J. A., R. Tsonaka, C. Gaujoux-Viala, B. Fautrel y A. H. van der Helm-van Mil (2015). *Evaluating relationships between symptom duration and persistence of rheumatoid arthritis: does a window of opportunity exist? Results on the Leiden early arthritis clinic and ESPOIR cohorts*. Ann Rheum Dis 74(5): 806-812.
- van Riel, P. L. y L. Renskers (2016). *The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol 34(5 Suppl 101): S40-S44.
- van Schaardenburg D., M. W. P., Boers M., Turk S., Marotta A. (2014a). *14-3-3 ϵ is an Independent Predictor of Radiographic Changes in Early RA and Higher Titres Inform A Higher Likelihood of Joint Damage Progression*. Ann Rheum Dis 73(Suppl. 2): 266.
- van Schaardenburg D., M. W. P., Marotta A. (2014b). *Lower levels of 14-3-3 ϵ predict DMARD associated remission at 1 year follow up*. Ann Rheum Dis 73(Suppl. 2): 381.
- van Steenberg, H. W., T. W. Huizinga y A. H. van der Helm-van Mil (2013). *The preclinical phase of rheumatoid arthritis: what is acknowledged and what needs to be assessed?* Arthritis Rheum 65(9): 2219-2232.
- van Tubergen, A. (2015). *The changing clinical picture and epidemiology of spondyloarthritis*. Nat Rev Rheumatol 11(2): 110-118.
- van Tuyl, L. H., A. E. Voskuyl, M. Boers, P. Geusens, R. B. Landewe, B. A. Dijkman y W. F. Lems (2010). *Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis 69(9): 1623-1628.
- van Venrooij, W. J., J. J. van Beers y G. J. Pruijn (2011). *Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future*. Nat Rev Rheumatol 7(7): 391-398.
- Vandooren, B., T. Cantaert, T. Noordenbos, P. P. Tak y D. Baeten (2008). *The abundant synovial expression of the RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in peripheral spondylarthritis is partially disconnected from inflammation*. Arthritis Rheum 58(3): 718-729.
- Vandooren, B., N. Yermenko, T. Noordenbos, J. Bras, P. P. Tak y D. Baeten (2009). *Mediators of structural remodeling in peripheral spondylarthritis*. Arthritis Rheum 60(12): 3534-3545.
- Vastesaeger, N., D. van der Heijde, R. D. Inman, Y. Wang, A. Deodhar, B. Hsu, M. U. Rahman, B. Dijkman, P. Geusens, B. Vander Cruyssen, E. Collantes, J. Sieper y J. Braun (2011). *Predicting the outcome of ankylosing spondylitis therapy*. Ann Rheum Dis 70(6): 973-981.
- Verpoort, K. N., H. van Dongen, C. F. Allaart, R. E. Toes, F. C. Breedveld y T. W. Huizinga (2004). *Undifferentiated arthritis--disease course assessed in several inception cohorts*. Clin Exp Rheumatol 22(5 Suppl 35): S12-17.
- Vessillier, S., G. Adams, T. Montero-Melendez, R. Jones, M. Seed, M. Perretti y Y. Chernajovsky (2012). *Molecular engineering of short half-life small peptides (VIP, α MSH and γ (3)MSH) fused to latency-associated peptide results in improved anti-inflammatory therapeutics*. Ann Rheum Dis 71(1): 143-149.
- Viatte, S., D. Plant, B. Han, B. Fu, A. Yarwood, W. Thomson, D. P. Symmons, J. Worthington, A. Young, K. L. Hyrich, et al. (2015). *Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response*. JAMA 313(16): 1645-1656.
- Viatte, S. y A. Barton (2017). *Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response*. Semin Immunopathol.
- Vijayan, E., W. K. Samson, S. I. Said y S. M. McCann (1979). *Vasoactive intestinal peptide: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone, luteinizing hormone, and prolactin in conscious ovariectomized rats*. Endocrinology 104(1): 53-57.
- Visser, K., K. N. Verpoort, H. van Dongen, S. M. van der Kooij, C. F. Allaart, R. E. Toes, T. W. Huizinga y A. H. van der Helm-van Mil (2008). *Pretreatment serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are associated with the response to methotrexate in recent-onset arthritis*. Ann Rheum Dis 67(8): 1194-1195.
- Voice, J. K., C. Grinninger, Y. Kong, Y. Bangale, S. Paul y E. J. Goetzl (2003). *Roles of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the expression of different immune phenotypes by wild-type mice and T cell-targeted type II VIP receptor transgenic mice*. J Immunol 170(1): 308-314.
- Vosa, U., T. Esko, S. Kasela y T. Annilo (2015). *Altered Gene Expression Associated with microRNA Binding Site Polymorphisms*. PLoS One 10(10): e0141351.
- Vosse, D., R. Landewe, P. Garnero, D. van der Heijde, S. van der Linden y P. Geusens (2008). *Association of markers of bone- and cartilage-degradation with radiological changes at baseline and after 2 years follow-up in patients with ankylosing spondylitis*. Rheumatology (Oxford) 47(8): 1219-1222.
- Vota, D., M. Agüero, E. Grasso, V. Hauk, L. Gallino, E. Soczewski, C. Perez Leiros y R. Ramhorst (2017).

- Progesterone and VIP cross-talk enhances phagocytosis and anti-inflammatory profile in trophoblast-derived cells. *Mol Cell Endocrinol* 443: 146-154.
- Waalder, E. (1940). *On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles*. 1939. *APMIS* 17: 172-188.
- Wagner, J. A. y A. J. Atkinson, Jr. (2015). *Measuring Biomarker Progress*. *Clin Pharmacol Ther* 98(1): 2-5.
- Ward, M. M., T. J. Learch, L. S. Gensler, J. C. Davis, Jr., J. D. Reveille y M. H. Weisman (2013). *Regional radiographic damage and functional limitations in patients with ankylosing spondylitis: differences in early and late disease*. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 65(2): 257-265.
- Ward, M. M., A. Deodhar, E. A. Akl, A. Lui, J. Ermann, L. S. Gensler, J. A. Smith, D. Borenstein, J. Hiratzka, P. F. Weiss, et al. (2016). *American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network 2015 Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis*. *Arthritis Rheumatol* 68(2): 282-298.
- Webster, J. I., L. Tonelli y E. M. Sternberg (2002). *Neuroendocrine regulation of immunity*. *Annu Rev Immunol* 20: 125-163.
- Wegner, N., R. Wait, A. Sroka, S. Eick, K. A. Nguyen, K. Lundberg, A. Kinloch, S. Culshaw, J. Potempa y P. J. Venables (2010). *Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 62(9): 2662-2672.
- Weigent, D. A., D. J. Carr y J. E. Blalock (1990). *Bidirectional communication between the neuroendocrine and immune systems. Common hormones and hormone receptors*. *Ann N Y Acad Sci* 579: 17-27.
- Welsing, P. M., A. M. van Gestel, H. L. Swinkels, L. A. Kiemeny y P. L. van Riel (2001). *The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum* 44(9): 2009-2017.
- Wellcome Trust Case Control, C., C. Australo-Anglo-American Spondylitis, P. R. Burton, D. G. Clayton, L. R. Cardon, N. Craddock, P. Deloukas, A. Duncanson, D. P. Kwiatkowski, M. I. McCarthy, et al. (2007). *Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants*. *Nat Genet* 39(11): 1329-1337.
- Wendling, D., P. Claudepierre y C. Prati (2013). *Early diagnosis and management are crucial in spondyloarthritis*. *Joint Bone Spine* 80(6): 582-585.
- Wendling, D. (2016). *The gut in spondyloarthritis*. *Joint Bone Spine* 83(4): 401-405.
- Westendorf, J. J., R. A. Kahler y T. M. Schroeder (2004). *Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases*. *Gene* 341: 19-39.
- Willemze, A., S. Bohringer, R. Knevel, E. W. Levarht, G. Stoeken-Rijsbergen, J. J. Houwing-Duistermaat, A. H. van der Helm-van Mil, T. W. Huizinga, R. E. Toes y L. A. Trouw (2012). *The ACPA recognition profile and subgrouping of ACPA-positive RA patients*. *Ann Rheum Dis* 71(2): 268-274.
- Winzell, M. S. y B. Ahren (2007). *Role of VIP and PACAP in islet function*. *Peptides* 28(9): 1805-1813.
- Wolford, J. K. y S. A. Signs (1995). *Binding of sequence-specific proteins to the 3'-untranslated region of vasoactive intestinal peptide mRNA*. *Biochem Biophys Res Commun* 211(3): 819-825.
- Wollman, Y., S. Blumberg, A. Spungin, D. E. Brenneman, M. Fridkin, J. Wollman, A. Iaina y I. Gozes (2002). *The increased proliferation of cultured neuroblastoma cells treated with vasoactive intestinal peptide is enhanced by simultaneous inhibition of neutral endopeptidase*. *Regul Pept* 108(2-3): 175-177.
- Woolf, A. D. (2009). *Economic Burden of Rheumatic Diseases*. *Kelley's Textbook of Rheumatology* R. C. B. Gary S. Firestein, Edward D. Harris, Jr, Iain B. McInnes, Shaun Ruddy & John S. Sargent. Philadelphia, Saunders/Elsevier: 439-449.
- Wooten, D., H. Lindmark, M. Kadmiel, H. Willcockson, K. M. Caron, J. Barwell, T. Drmota y D. R. Poyner (2013). *Receptor activity modifying proteins (RAMPs) interact with the VPAC2 receptor and CRF1 receptors and modulate their function*. *Br J Pharmacol* 168(4): 822-834.
- Wray, V., C. Kakoschke, K. Nokihiro y S. Naruse (1993). *Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *Biochemistry* 32(22): 5832-5841.
- Wright, V. (1978). *Seronegative polyarthritis: a unified concept*. *Arthritis Rheum* 21(6): 619-633.
- www.arthritis.org (2016). The Arthritis Foundation
- Xie, W., L. Zhou, S. Li, T. Hui y D. Chen (2016). *Wnt/beta-catenin signaling plays a key role in the development of spondyloarthritis*. *Ann N Y Acad Sci* 1364: 25-31.

- Yadav, M., M. C. Huang y E. J. Goetzl (2011). *VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis*. *Cell Immunol* 267(2): 124-132.
- Yamanishi, Y., D. L. Boyle, M. Clark, R. A. Maki, M. D. Tortorella, E. C. Arner y G. S. Firestein (2002). *Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta*. *J Immunol* 168(3): 1405-1412.
- Yi, J. P., Y. Z. Wu, N. Yu, Z. W. Yu, F. Y. Xie y Q. Yuan (2016). *VEGF Gene Polymorphisms Affect Serum Protein Levels and Alter Disease Activity and Synovial Lesions in Rheumatoid Arthritis*. *Med Sci Monit* 22: 316-324.
- Ytterberg, A. J., V. Joshua, G. Reynisdottir, N. K. Tarasova, D. Rutishauser, E. Ossipova, A. Haj Hensvold, A. Eklund, C. M. Skold, J. Grunewald, et al. (2015). *Shared immunological targets in the lungs and joints of patients with rheumatoid arthritis: identification and validation*. *Ann Rheum Dis* 74(9): 1772-1777.
- Zeidler, H. (2012). *The need to better classify and diagnose early and very early rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol* 39(2): 212-217.
- Zhang, X., D. Zhang, H. Jia, Q. Feng, D. Wang, D. Liang, X. Wu, J. Li, L. Tang, Y. Li, et al. (2015). *The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment*. *Nat Med* 21(8): 895-905.
- Zhao, P. W., W. G. Jiang, L. Wang, Z. Y. Jiang, Y. X. Shan y Y. F. Jiang (2014). *Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF-alpha, IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis*. *PLoS One* 9(5): e95346.
- Zheng, Y., L. Sun, T. Jiang, D. Zhang, D. He y H. Nie (2014). *TNFalpha promotes Th17 cell differentiation through IL-6 and IL-1beta produced by monocytes in rheumatoid arthritis*. *J Immunol Res* 2014: 385352.
- Zhou, Q., S. Haupt, J. T. Kreuzer, A. Hammitzsch, F. Proft, C. Neumann, J. Leipe, M. Witt, H. Schulze-Koops y A. Skapenko (2015a). *Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis* 74(6): 1265-1274.
- Zhou, Y., T. Di Pucchio, G. P. Sims, N. Mittereder y T. Mustelin (2015b). *Characterization of the Hypercitrullination Reaction in Human Neutrophils and Other Leukocytes*. *Mediators Inflamm* 2015: 236451.
- Zhu, J., X. Y. Chen, L. B. Li, X. T. Yu, Y. Zhou, W. J. Yang, Z. Liu, N. Zhao, C. Fu, S. H. Zhang y Y. F. Chen (2015). *Electroacupuncture attenuates collagen-induced arthritis in rats through vasoactive intestinal peptide signalling-dependent re-establishment of the regulatory T cell/T-helper 17 cell balance*. *Acupunct Med* 33(4): 305-311.
- Zinovieva, E., C. Bourgain, A. Kadi, F. Letourneur, B. Izac, R. Said-Nahal, N. Lebrun, N. Cagnard, A. Vigier, S. Jacques, et al. (2009). *Comprehensive linkage and association analyses identify haplotype, near to the TNFSF15 gene, significantly associated with spondyloarthritis*. *PLoS Genet* 5(6): e1000528.

Resumen/Abstract

VII. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La **Artritis Reumatoide** (AR) y la **Espondiloartritis** (EspA) son enfermedades reumáticas inflamatorias y crónicas con un importante componente autoinmune, cuya progresión conduce a la destrucción de las estructuras articulares y con ello a una severa incapacidad funcional y grave deterioro de la calidad de vida de los pacientes [1, 2].

En ambas patologías, la gravedad aumenta debido al largo periodo de tiempo transcurrido desde el comienzo de la enfermedad hasta su diagnóstico e inicio del tratamiento. Sin embargo, una actuación terapéutica precoz durante la **ventana de oportunidad** [3-7] basada en **estrategias terapéuticas personalizadas** es capaz de ralentizar o incluso modificar el curso natural de la enfermedad [8, 9].

Los **biomarcadores validados** hasta la fecha, en AR (fundamentalmente factor reumatoide y anticuerpos contra proteínas citrulinadas, ACPA) y en EspA (HLA-B27⁺ y proteína C reactiva), resultan **insuficientes** para clasificar a los pacientes con previsión de peor curso evolutivo y que, por tanto, se beneficiarían de un tratamiento temprano más agresivo [1, 10-13]. Así, existen aún importantes desafíos en la búsqueda de biomarcadores pronóstico.

El **Péptido Intestinal Vasoactivo** (VIP) es ampliamente reconocido por sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras [14], muchas de ellas dentro del contexto de las propias enfermedades reumáticas [15-18]. VIP ejerce sus funciones a través de 3 receptores acoplados a proteína G (**VPAC1**, **VPAC2**, **PAC1**), presentes en células inmunocompetentes [19]. Se ha descrito que los perfiles de expresión del eje VIP/Receptores se encuentran alterados en diversas enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, el Crohn o el Sjögren [20-22].

Combinando su relevancia en el contexto de las enfermedades reumáticas con su desregulación en otras patologías autoinmunes, nos preguntamos si el **eje VIP/Receptores** podría servir como **biomarcador pronóstico** en las dos enfermedades estudiadas.

OBJETIVOS

1. Determinar la evolución de los niveles séricos de VIP en el seguimiento de pacientes con AR y EspA temprana, analizando su relación con parámetros clínicos de la enfermedad.
2. Secuenciar el gen de *VIP* en pacientes con AR temprana y niveles extremos de VIP sérico, en busca de variantes genéticas que expliquen las diferencias de expresión. Analizar su relación con la severidad de la enfermedad.
3. Caracterizar el patrón de expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con AR temprana, relacionándolo con la severidad de la enfermedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Múltiples evidencias señalan al VIP como regulador del proceso inflamatorio que contribuye a la patogénesis de las enfermedades reumáticas. Nuestros resultados revelan, por primera vez, que pacientes con AR y EspA tempranas incapaces de *up*-regular sus niveles séricos de VIP experimentan peor curso evolutivo, posiblemente como consecuencia de su incapacidad para controlar la respuesta autoinmune/inflamatoria.

En AR, pacientes con niveles bajos de VIP tienen mayores puntuaciones del DAS28, basalmente y tras dos años de seguimiento. Este hallazgo se sustenta en numerosos efectos antiartríticos de VIP, tales como la regulación de los perfiles de citocinas pro/antiinflamatorias o la atenuación de la incidencia y severidad de la enfermedad en el modelo de CIA, modulando las respuestas Th1/Th2-Treg. Además, en OA se han relacionado previamente bajos niveles de VIP en líquido sinovial y cartílago articular con mayor daño estructural. Adicionalmente, verificamos la interacción de VIP con el estatus ACPA^{+/·}. Pacientes ACPA[·] con bajos niveles de VIP sérico sufren mayor actividad que los ACPA[·] con niveles normales del péptido. Además, pacientes ACPA⁺ con bajos niveles de VIP tienen un mayor requerimiento de FAMEs que los ACPA⁺ con niveles normales. Estos hallazgos respaldan el papel de VIP como marcador pronóstico, complementando el valor predictivo de los ACPA.

Centrándonos en la EspA, describimos la relación entre bajos niveles séricos de VIP y el incremento de severidad de la enfermedad en términos de mayor deterioro funcional (BASFI) y presencia de sacroileitis. Asimismo, niveles bajos de VIP se asocian a mayor carga

inflamatoria (entesitis, anemia y psoriasis). Estos resultados apoyan el valor predictivo del péptido y su papel como marcador de severidad.

Hasta el momento, existen pocos estudios sobre cómo la variabilidad genética puede modular la severidad de la AR. Nuestros resultados, validados en dos subpoblaciones de pacientes con AR temprana, revelan por primera vez la existencia de polimorfismos en el gen de *VIP* asociados a sus niveles séricos. La relación entre variantes genéticas y niveles de proteína ha sido previamente descrita, por ejemplo, para VEGF, folato y metaloproteinasas.

Comprobamos que el polimorfismo rs688136 (localizado en 3'UTR) se encuentra cerca de la diana del miR-205-5p. La presencia del alelo C se asocia con un aumento de expresión de *VIP* como consecuencia, posiblemente, de la alteración de la regulación por dicho microRNA.

Dada la asociación entre niveles bajos de *VIP* y peor curso clínico, estudiamos los polimorfismos, en interacción, como potenciales indicadores de severidad en AR. Observamos que la combinación de genotipos asociada a niveles más bajos de *VIP* se asocia también con mayores requerimientos de tratamiento con FAMES, siendo ésta una buena señal subrogada de gravedad. La predicción de la severidad del curso clínico a partir de variantes genéticas, combinadas con parámetros clínicos, se ha descrito previamente en patologías como la AR, la EspA y la OA.

En cuanto a los receptores de *VIP*, a lo largo del seguimiento de pacientes con AR temprana, la expresión de VPAC1 y VPAC2 muestra una correlación inversa. El incremento de VPAC1, paralelo al decremento de VPAC2, sugiere una regulación dinámica a modo de mecanismo compensatorio. Adicionalmente, describimos una correlación negativa entre las expresiones de VPAC1 e IL-6, señalando la baja expresión del receptor como marcador de un proceso inflamatorio más intenso. Asimismo, observamos que pacientes con actividad moderada/alta de la enfermedad (en términos de DAS28 y GDA) muestran los niveles más bajos de VPAC1. Dado que la activación selectiva de VPAC1 es más eficaz que la de VPAC2 controlando la respuesta inmune y que sus niveles también son bajos en patologías como la esclerosis y la artrosis, postulamos el posible papel protector de VPAC1 y señalamos su relevancia clínica como marcador de actividad/severidad en AR.

CONCLUSIONES

1. Pacientes con AR temprana incapaces de up-regular sus niveles séricos de *VIP* sufren un peor curso evolutivo de la enfermedad a pesar de recibir más tratamiento.

2. Pacientes con EspA temprana y bajos niveles de VIP sérico experimentan mayor carga inflamatoria de la enfermedad y peor evolución en términos de funcionalidad.
3. Polimorfismos presentes en el gen de *VIP* se asocian con sus niveles séricos. El rs688136 se asocia con un incremento en dichos niveles, probablemente, por alteración de la regulación mediante microRNAs.
4. Dichos polimorfismos interaccionan entre sí. Determinadas combinaciones de genotipos se asocian con mayores requerimientos de tratamiento.
5. A lo largo del seguimiento de pacientes con AR temprana se observa un cambio inverso en la expresión de los receptores VPAC1 y VPAC2.
6. Pacientes con baja expresión de VPAC1 presentan mayor carga inflamatoria y mayor actividad de la enfermedad.

VII. ABSTRACT

BACKGROUND

Rheumatoid arthritis (RA) and **Spondyloarthritis** (SpA) are inflammatory and chronic rheumatic diseases with a significant autoimmune component. Its progression leads to the destruction of joint structures and, consequently, to severe functional impairment and serious worsening of patient's quality of life [1, 2].

In both diseases, severity increases due to the long period of time from onset to diagnosis and treatment establishment. Nevertheless, an early therapeutic intervention during the **window of opportunity** [3-7] based on **customized therapeutic strategies** is able to slow or even modify the natural course of the disease [8, 9].

To date, **validated biomarkers** in RA (mainly rheumatoid factor and anti-citrullinated proteins antibodies, ACPA) and in SpA (essentially HLA-B27⁺ and C-reactive protein), are **insufficient** to classify patients who are expected to undergo worse clinical course of the disease and, consequently, who would benefit from more aggressive early treatment [1, 10-13]. Thus, there are still major challenges in the search for prognostic biomarkers.

The antiinflammatory and immunomodulatory properties of the **Vasoactive Intestinal Peptide** (VIP) are broadly documented [14] being many of them described within the context of rheumatic diseases [15-18]. VIP exerts its biological functions through three G protein-coupled receptors (**VPAC1, VPAC2, PAC1**), found in immunocompetent cells [19]. The expression profile of the VIP/Receptors axis have been reported to be altered in several autoimmune diseases such as multiple sclerosis, Crohn's disease and Sjögren's syndrome [20-22].

Considering its relevance in the context of rheumatic diseases and its deregulation in other autoimmune pathologies, we examined if the **VIP/Receptors axis** could serve as a **prognostic biomarker** in the two studied diseases.

OBJECTIVES

1. To determine the evolution of VIP serum levels during the follow-up of early RA and early SpA patients, analyzing their association with clinical parameters of the disease.

2. To sequence *VIP* gene in early RA patients with extreme VIP serum levels, in search of genetic variants that could explain expression differences, and to analyze their association with disease severity.
3. To characterize the expression pattern of VPAC1 and VPAC2 receptors in peripheral blood mononuclear cells from early RA patients, relating it to disease severity.

RESULTS AND DISCUSSION

There are multiple evidences pointing to VIP as a relevant regulator of the inflammatory process that contributes to rheumatic diseases pathogenesis. Our results reveal, for the first time, that early RA and early SpA patients who are unable to up-regulate their VIP serum levels suffer worse clinical course in both disorders, probably because they fail to control the autoimmune and inflammatory responses.

RA patients with low VIP levels have higher DAS28 scores both at baseline and after two years of follow-up. This finding could be explained by the numerous anti-arthritic effects of VIP, such as regulation of pro/antiinflammatory cytokine profiles or the attenuation of disease incidence and severity in the CIA model, modulating Th1/Th2-Treg responses. In addition, low VIP levels in synovial fluid and articular cartilage from osteoarthritis (OA) patients have been previously associated with increased structural damage. Moreover, we verify the interaction between VIP and ACPA^{+/−} status. ACPA[−] patients with low VIP serum levels show greater disease activity than ACPA[−] with normal levels of the peptide. Besides, ACPA⁺ patients with low VIP levels have a higher requirement for DMARDs than ACPA⁺ patients with normal levels. These findings support the role of VIP as a prognostic marker, supplementing the predictive value of ACPA.

Focusing on SpA, we describe the association between low VIP serum levels and increased disease severity in terms of greater functional impairment (in terms of BASFI) and presence of sacroiliitis. Likewise, low VIP levels are linked to an enlarged inflammatory burden with enthesitis, anemia and psoriasis. These results support the predictive value of the peptide and its role as a severity biomarker.

So far, there are few studies on how genetic variability can modulate RA severity. Our results, validated in two subpopulations of patients with early RA, reveal for the first time the existence of polymorphisms in the *VIP* gene associated to its serum levels. The association between genetic variants and protein levels has been previously described, for example in the case of VEGF, folate and some metalloproteinases.

We found that the rs688136 polymorphism (located in 3'UTR) is close to a putative target of miR-205-5p. The presence of the C allele of this polymorphism associates with increased *VIP* gene expression, probably as a consequence of the microRNA regulation disruption.

Given the previously described association between low VIP levels and worse clinical course of the disease, we study the interaction of these polymorphisms as potential indicators of RA severity. We observe that the genotype combination associated with lower VIP levels is also linked with higher requirements of DMARD therapy, being this parameter a good surrogate marker of severity. Predicting the clinical course severity by means of a combination of genetic variants and clinical parameters, has been previously described in diseases such as RA, SpA and OA.

Regarding to VIP receptors we found that, during early RA patient's follow-up, the expression of VPAC1 and VPAC2 displayed an inverse correlation. The increase of VPAC1, concurrent to the decrease of VPAC2, suggests a dynamic regulation as a kind of compensatory mechanism. Furthermore, we describe a negative correlation between VPAC1 and IL-6 expressions, indicating that a lower expression of this receptor could be a marker of a more intense inflammatory process. We also observed that patients with moderate/high disease activity (in terms of DAS28 and GDA) show the lowest levels of VPAC1. Given the fact that selective activation of VPAC1 is more effective than VPAC2 controlling the immune response, together with its low levels in diseases such as multiple sclerosis and OA, we propose herein the potential protective role of VPAC1 and its clinical relevance as activity/severity biomarker in RA.

CONCLUSIONS

1. Early RA patients unable to up-regulate VIP serum levels suffer a worse course of disease even receiving more treatment.
2. Early SpA patients with low VIP serum levels undergo a greater inflammatory burden of disease and worse evolution in terms of functional capacity.
3. Polymorphisms present in *VIP* gene are associated with its serum levels. The rs688136 is linked with increased levels, probably by altering a microRNA regulatory mechanism.
4. These polymorphisms interact with each other and certain combinations of genotypes are associated with higher treatment requirements.
5. Along early RA patient's follow-up there is an inverse correlation in the expression of VPAC1 and VPAC2 receptors.

6. Patients with low VPAC1 expression have higher inflammatory load and increased disease activity.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Firestein, G.S.yI.B. McInnes (2017). *Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis*. *Immunity* 46(2): p. 183-196.
2. Garg, N., F. van den Bosch y A. Deodhar (2014). *The concept of spondyloarthritis: where are we now?* *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28(5): p. 663-672.
3. Raza, K., T.P. Saber, T.K. Kvien, P.P. Taky D.M. Gerlag (2012). *Timing the therapeutic window of opportunity in early rheumatoid arthritis: proposal for definitions of disease duration in clinical trials*. *Ann Rheum Dis* 71(12): p. 1921-1923.
4. Smolen, J.S.yD. Aletaha (2015). *Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges*. *Nat Rev Rheumatol* 11(5): p. 276-289.
5. Claudepierre, P. (2014). *Spondyloarthritis: a window of opportunity?* *Joint Bone Spine* 81(3): p. 197-199.
6. Wendling, D., P. Claudepierre y C. Prati (2013). *Early diagnosis and management are crucial in spondyloarthritis*. *Joint Bone Spine* 80(6): p. 582-585.
7. Robinson, P.C.yM.A. Brown (2014). *The window of opportunity: a relevant concept for axial spondyloarthritis*. *Arthritis Res Ther* 16(3): p. 109.
8. Smolen, J.S., F.C. Breedveld, G.R. Burmester, V. Bykerk, M. Dougados, et al. (2016). *Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force*. *Ann Rheum Dis* 75(1): p. 3-15.
9. Smolen, J.S., J. Braun, M. Dougados, P. Emery, O. Fitzgerald, et al. (2014). *Treating spondyloarthritis, including ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis, to target: recommendations of an international task force*. *Ann Rheum Dis* 73(1): p. 6-16.
10. de Rooy, D.P., M.P. van der Linden, R. Knevel, T.W. Huizinga y A.H. van der Helm-van Mil (2011). *Predicting arthritis outcomes--what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic?* *Rheumatology (Oxford)* 50(1): p. 93-100.
11. Gonzalez-Alvaro, I., A.M. Ortiz, I.V. Seoane, R. Garcia-Vicuna, C. Martinez, et al. (2015). *Biomarkers predicting a need for intensive treatment in patients with early arthritis*. *Curr Pharm Des* 21(2): p. 170-181.
12. Chung, H.Y., P. Machado, D. van der Heijde, M.A. D'Agostino y M. Dougados (2011). *HLA-B27 positive patients differ from HLA-B27 negative patients in clinical presentation and imaging: results from the DESIR cohort of patients with recent onset axial spondyloarthritis*. *Ann Rheum Dis* 70(11): p. 1930-1936.
13. Poddubnyy, D.A., M. Rudwaleit, J. Listing, J. Braun y J. Sieper (2010). *Comparison of a high sensitivity and standard C reactive protein measurement in patients with ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis*. *Ann Rheum Dis* 69(7): p. 1338-1341.
14. Gomariz, R.P., Y. Juarranz, C. Abad, A. Arranz, J. Leceta, et al. (2006). *VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy*. *Ann N Y Acad Sci* 1070: p. 51-74.
15. Delgado, M., C. Abad, C. Martinez, J. Leceta y R.P. Gomariz (2001). *Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease*. *Nat Med* 7(5): p. 563-568.
16. Juarranz, Y., I. Gutierrez-Canas, B. Santiago, M. Carrion, J.L. Pablos, et al. (2008). *Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts*. *Arthritis Rheum* 58(4): p. 1086-1095.
17. Gutierrez-Canas, I., Y. Juarranz, B. Santiago, C. Martinez, R.P. Gomariz, et al. (2008). *Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis*. *Brain Behav Immun* 22(3): p. 312-317.
18. Carrion, M., S. Perez-Garcia, R. Jimeno, Y. Juarranz, I. Gonzalez-Alvaro, et al. (2013). *Inflammatory mediators alter interleukin-17 receptor, interleukin-12 and -23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immunomodulation by vasoactive intestinal Peptide*. *Neuroimmunomodulation* 20(5): p. 274-284.
19. Harmar, A.J., J. Fahrenkrug, I. Gozes, M. Laburthe, V. May, et al. (2012). *Pharmacology and functions of receptors*

- for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. Br J Pharmacol 166(1): p. 4-17.
20. Sun, W., J. Hong, Y.C. Zang, X. LiuyJ.Z. Zhang (2006). *Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis*. Int Immunol 18(12): p. 1691-1700.
 21. Lodde, B.M., F. Mineshiba, J. Wang, A.P. Cotrim, S. Afione, et al. (2006). *Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome*. Ann Rheum Dis 65(2): p. 195-200.
 22. Abad, C., C. Martinez, M.G. Juarranz, A. Arranz, J. Leceta, et al. (2003). *Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease*. Gastroenterology 124(4): p. 961-971.

Otras Publicaciones

VIII. OTRAS PUBLICACIONES

- *Healthy and Osteoarthritic Synovial Fibroblasts Produce a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 4, 5, 7, and 12: Induction by IL-1 β and Fibronectin and Contribution to Cartilage Damage.*

Pérez-García S, Gutiérrez-Cañas I, **Seoane IV**, Fernández J, Mellado M, Leceta J, Tío L, Villanueva-Romero R, Juarranz Y, Gomariz RP. *Am J Pathol.* **2016** Sep;186(9):2449-61.

- *VIP Modulates IL-22R1 Expression and Prevents the Contribution of Rheumatoid Synovial Fibroblasts to IL-22-mediated Joint Destruction.*

Carrión M, Juarranz Y, **Seoane IV**, Martínez C, González-Álvaro I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I, Gomariz RP. *J Mol Neurosci.* **2014** Jan;52(1):10-7.

